

**SKELETTMUSKELGEWEBSVERÄNDERUNGEN
NACH KÄLTEEINWIRKUNG
EIN MORPHOLOGISCHER VERGLEICH ZWISCHEN
FRISCHFLEISCH UND AUFGETAUTEM
GEFRIERFLEISCH BEIM SCHWEIN**

Gabriele Kammerl

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Tieranatomie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Lehrstuhl: Prof. Dr. F. Sinowatz)

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. H.-G. Liebich

SKELETTMUSKELGEWEBSVERÄNDERUNGEN NACH KÄLTEEINWIRKUNG -
EIN MORPHOLOGISCHER VERGLEICH ZWISCHEN FRISCHFLEISCH UND AUFGETAUTEM
GEFRIERFLEISCH BEIM SCHWEIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Gabriele Kammerl
aus
Dachau

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. H.G. Liebich
Korreferent:	Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

1.1.1. Die Bedeutung der Eltern

1.1.1.1. Die Rolle der Eltern in der Kindheit

1.1.1.2. Die Rolle der Eltern in der Jugend

1.1.1.3. Die Rolle der Eltern in der Erwachsenenzeit

1.1.1.4. Die Rolle der Eltern in der Alterung

1.1.1.5. Die Rolle der Eltern in der Gesellschaft

1.1.1.6. Die Rolle der Eltern in der Kultur

Meinen Eltern gewidmet

1.1.2. Die Bedeutung der Eltern in der Kindheit

1.1.2.1. Die Rolle der Eltern in der Kindheit

1.1.2.2. Die Rolle der Eltern in der Jugend

1.1.2.3. Die Rolle der Eltern in der Erwachsenenzeit

1.1.2.4. Die Rolle der Eltern in der Alterung

1.1.2.5. Die Rolle der Eltern in der Gesellschaft

1.1.2.6. Die Rolle der Eltern in der Kultur

1.1.2.7. Die Rolle der Eltern in der Politik

1.1.2.8. Die Rolle der Eltern in der Wirtschaft

1.1.2.9. Die Rolle der Eltern in der Wissenschaft

1.1.2.10. Die Rolle der Eltern in der Kunst

2. Die Bedeutung der Eltern in der Kindheit

2.1. Die Rolle der Eltern in der Kindheit

2.1.1. Die Rolle der Eltern in der Kindheit

2.1.2. Die Rolle der Eltern in der Jugend

2.1.3. Die Rolle der Eltern in der Erwachsenenzeit

2.1.4. Die Rolle der Eltern in der Alterung

2.1.5. Die Rolle der Eltern in der Gesellschaft

2.1.6. Die Rolle der Eltern in der Kultur

2.1.7. Die Rolle der Eltern in der Politik

2.1.8. Die Rolle der Eltern in der Wirtschaft

2.1.9. Die Rolle der Eltern in der Wissenschaft

2.1.10. Die Rolle der Eltern in der Kunst

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Das Skelettmuskelgewebe als Organ	2
2.1.1. Struktureller Aufbau des Skelettmuskelgewebes	2
2.1.2. Funktionelle Einrichtungen des Skelettmuskelgewebes	3
2.1.3. Einteilung der Skelettmuskelfasern	5
2.1.4. Feinbau der Muskelfasern und organspezifische Einrichtungen	8
2.1.5. Kontraktile, regulatorische und Strukturproteine	11
2.1.6. Vorgang der Kontraktion	15
2.1.7. Energiestoffwechsel der Muskelzelle	17
2.1.8. Biochemische und strukturelle Veränderungen von Skelettmuskelgewebe post mortem	20
2.1.8.1. Rigor mortis	20
2.1.8.2. Temperaturabhängige postmortale Phänomene	22
2.1.8.3. Post-Rigor-Mechanismen (Fleischreifung)	27
2.2. Der Gefriervorgang und seine Auswirkungen auf das Muskelgewebe	29
2.2.1. Physikalische Grundlagen des Gefriervorganges	29
2.2.2. Einfluß der Gefriergeschwindigkeit auf biologische Systeme	30
2.2.3. Schädigungen durch Gefriereinwirkung	32
2.3. Bedeutung der Lektine und ihr Einsatz in der Muskelforschung	37

3. MATERIAL UND METHODE

40

3.1. Untersuchungsmaterial

40

3.2. Histologische Untersuchungsmethoden

41

3.2.1. Probenpräparation für die Lichtmikroskopie

41

3.2.2. Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

41

3.2.3. Methodik der morphometrischen Auswertung

42

3.2.4. Probenpräparation für die Lektin-Fluoreszenzmikroskopie

42

3.3. Bewertungsmaßstäbe für die Beurteilung der histologischen Veränderungen an Frischfleischproben und an aufgetauten Gefrierfleischstücken

44

4. ERGEBNISSE

48

4.1. Lichtmikroskopische Ergebnisse

48

4.1.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen an Frischfleischproben 24 Stunden nach der Schlachtung (Kontrollproben) der Schweine

48

4.1.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen an aufgetauten Gefrierfleischproben von Schweinen nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsproben)

51

4.2. Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse

62

4.3. Morphometrische Untersuchungen an Frischfleischproben (K) und an aufgetauten Gefrierfleischproben (V) beim Schwein

65

	Seite
4.4. Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse	66
4.4.1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Frischfleischproben 24 Stunden nach der Schlachtung (Kontrollproben) der Schweine	66
4.4.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an aufgetauten Gefrierfleischproben von Schweinen nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsproben)	71
4.5. Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	80
5. DISKUSSION	88
6. ZUSAMMENFASSUNG	98
7. SUMMARY	101
8. LITERATURVERZEICHNIS	104

1. EINLEITUNG

Die Vorbehandlung von Schweinefleisch durch Kälteeinwirkung ohne vorherige Trichinenschau ist durch die Richtlinie Nr. 77/96/EWG des Rates vom 21.12.1976, in Verbindung mit der Richtlinie des Rates vom 7.2.1983 zur Änderung der Richtlinie 64/433/EWG zur Regelung gesundheitlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit frischem Fleisch und nach Art. 4 (1) in Verbindung mit Anhang I der Richtlinie 77/96/EWG gesetzlich zugelassen.

Der Gesetzgeber geht hierbei davon aus, daß nach unterbliebener Trichinenschau im Sinne von Anhang I, Kap. VII Nr. 41/Buchstabe D eine Gefrierbehandlung des Schweinefleisches als gesundheitlich unbedenklich anzusehen ist.

Diese EG-Regelung ist in der BRD auch in nationales Recht überführt worden, und zwar nach § 1, Abs. 3 des Fleischhygienegesetzes vom 24.2.1987 bei Hausschweinen und bei Sumpfbibern.

Zum Schutz des Verbrauchers vor Falschdeklaration aufgetauten Gefrierfleisches und in besonderem Maße zum Schutz vor gesundheitlichen Schäden bei etwaigem Mißbrauch der oben genannten Regelungen ist es notwendig, über wissenschaftlich geeignete Nachweismethoden zur Kältevorbehandlung des Schweinefleisches zu verfügen.

Bislang liegen nur biochemische Nachweisverfahren vor; entsprechende morphologische Untersuchungen fehlen beim Schweinefleisch. Es existieren jedoch Erkenntnisse zur Mikromorphologie von Frisch- und aufgetautem Gefrierfleisch beim Rind, die durch Anwendung verschiedener histologischer Untersuchungstechniken erarbeitet wurden. Diese speziellen Untersuchungsmethoden können auch zum Nachweis aufgetauten Schweinefleisches herangezogen werden, bedürfen jedoch im Hinblick auf die besonderen strukturellen Verhältnisse des Skelettmuskulgewebes beim Schwein einer gezielten Überprüfung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, an Hand histologischer Untersuchungsmethoden strukturelle Unterschiede zwischen Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch zu erfassen.



2. LITERATUR

2.1. Das Skelettmuskelgewebe als Organ

2.1.1. Struktureller Aufbau des Skelettmuskelgewebes

Das Grundelement des Skelettmuskelgewebes ist die quergestreifte Muskelfaser.

Die Querstreifung als Charakteristikum des Skelettmuskels wurde bereits im Jahre 1685 von A. von Leeuwenhoek entdeckt.

Die einzelne Skelettmuskelfaser entspricht einem vielkernigen Plasmodium, das einen Durchmesser von ca. 9-100 μm aufweist und eine Länge von mehreren Zentimetern erreichen kann.

Jede Faser wird von einem isolierbaren Grenzhäutchen umschlossen. Dieses besteht aus einer die Zellmembran bedeckenden Basallamina und einem Strumpf von argyrophilen Bindegewebsfäserchen. Die Nomenklatur ist bislang nicht eindeutig. Einige Autoren bezeichnen diese Bindegewebshülle niedrigster Ordnung als Sarkolemm, wobei sie ihr aber das Plasmalemm hinzurechnen. BARGMANN (1977) bevorzugt unter Berücksichtigung der natürlichen Phasengrenzen eine Unterscheidung zwischen dem Sarkolemm als dem Plasmalemm der Muskelfaser und dem extrazellulären Myolemm, der Umhüllung aus Gitterfaserstrumpf und Basallamina.

Die Skelettmuskelfasern sind streng nach einem Schachtelprinzip angeordnet: zwischen mehreren Einzelfasern breitet sich ein lockeres, kappillar und nervenreiches Bindegewebe, das Endomysium, aus. Durch seine Formierung zu einer scherengitterartigen Hülle aus Kollagenfasern und interstitiellem Bindegewebe, welche als Perimysium internum bezeichnet wird, bildet es die Primärbündel, die als kleinste funktionelle Einheiten des Muskels gelten.

Eine Anzahl solcher Primärbündel ist ebenfalls von einem lockeren, sich überkreuzenden Bindegewebsgerüst, dem Perimysium externum umschlossen, in welches zahlreiche Arterien, Venen und Nerven eingebettet sind.

Die so entstehenden Sekundärbündel sind in ihrer Gesamtheit umgeben von einer Schicht lockeren Bindegewebes, dem Epimysium. Durch die abschließende, straff organisierte Faszie entsteht das Organsystem Skelettmuskel.

Sämtliche bindegewebige Strukturen des Muskels bilden ein streng organisiertes System, das sich in die Umhüllung der Sehne fortsetzt. Die Staffelung der Muskelfaserinsertionen am Sehnenblatt und der Übergang der Muskelfasern ins Sehnenblatt in einem mehr oder weniger spitzen Winkel sorgen dafür, daß alle Muskeln gefiedert erscheinen. Durch diese Faseranordnung wird Raum gewonnen für die mit der Kontraktion einhergehende Dickenzunahme der Faserbündel. Außerdem wird dadurch eine Kompression der intramuskulären Gefäße und Nerven während der Verkürzungsphase vermieden (NICKEL et al., 1987).

2.1.2. Funktionelle Einrichtungen des Skelettmuskelgewebes

a) Muskelspindeln:

Die Muskelspindeln fungieren als Propiozeptoren der Skelettmuskulatur und sind für Muskeltonus und fein abgestufte Koordination verantwortlich. Diese intrafusalen (fusus = Spindel), nur schwach quergestreiften Muskelfasern sind parallel zur extrafusalen Arbeitsmuskulatur angeordnet.

Sie sind zusammengesetzt aus einer äußeren und einer inneren endothel ausgekleideten Bindegewebskapsel und drei bis sechs modifizierten Muskelfasern. Zwischen der Spindelkapsel und dem Faserbündel befindet sich ein mit Flüssigkeit gefüllter Spaltraum, dessen Zellauskleidung die Fortsetzung des Neurothels der in die Spindel eintretenden Nerven bildet (v. DÜRING, 1969).

Je nach Kernanordnung lassen sich 2 Typen von intrafusalen Muskelfasern unterscheiden: die Kernhaufen-Fasern ("nuclear bag" Fasern) und die Kernketten-Fasern ("nuclear chain" Fasern).

Gemäß ihrer Funktion als Dehnungsfühler und Bestandteil eines monosynaptischen Reflexbogens werden die Muskelspindeln sowohl sensibel über dicke, markhaltige I α - und dünnere II-Nervenfasern, als auch moto-

risch über dünne, markarme γ -Motoneurone innerviert.

b) Blutgefäße:

Entsprechend der Stoffwechselintensität der Muskulatur ist ihre Blutversorgung sehr ausgeprägt. Arteriolen und Venolen mittlerer Größe verlaufen im Perimysium internum und externum und dringen senkrecht in die Primärbündel ein. Das aus ihnen hervorgehende anastomosienreiche Kapillarnetz, welches aus geschlängelten, in Faserrichtung verlaufenden Haargefäßen besteht, liegt der Oberfläche der Muskelfasern dicht an (HAMMERSEN, 1964). Die Schlängelung der Gefäße wird während des Kontraktionsvorganges verstärkt. Die Durchblutung und die Anzahl der Kapillaren stehen in enger Beziehung zu den verschiedenen Fasertypen und deren Metabolismus.

c) Spezifische Nervenendigungen:

Die peripheren Nervenendigungen können sowohl im Perimysium als auch in ihrer terminalen Aufzweigung als motorische Endplatte im Endomysium und im Myolemm nachgewiesen werden (Metallimprägnation).

An der myoneuronalen Berührungsfläche verlieren dabei die markhaltigen Muskelnerven ihre Scheide, so daß die kolbenähnlich sich verästelnden Achsenzyylinder hier nur noch von Schwannschen Zellen umhüllt werden. Die Zahl der von einem motorischen Neuron versorgten Muskelfasern bildet eine motorische Einheit. Sie kann je nach Anforderung an die Leistungsfähigkeit eines Muskels zwischen wenigen bis mehreren hundert variieren. Von der Anzahl dieser motorischen Einheiten ist die Aktivitätsabstufung und die Kraft eines Skelettmuskels abhängig.

Die Qualität der Muskelfasern wird bestimmt durch die Nervenfasergüte der sie versorgenden Neurone (GAUTHIER et al., 1978).

d) Satellitenzellen:

Die Satellitenzellen sind abgeflachte, zytoplasmaarme Zellen mit spärlich entwickelten Zellorganellen, einem im Verhältnis zur Muskelzelle chromatinreicheren Kern und Zentriolen. Die zur DNS-Synthese und Mitose befähigten Zellen liegen zwischen Basallamina und Plasmalemm der Muskelfasern und sind deshalb nur elektronenmikroskopisch eindeutig

nachweisbar. Sie werden als undifferenzierte Stammzellen angesehen, die sich im Falle einer notwendig werdenden Regeneration in myoblasten-ähnliche Elemente umwandeln können (KRSTIC, 1978).

2.1.3. Einteilung der Skelettmuskelfasern

Noch vor der Entdeckung der Querstreifung beschrieb LORENZI im Jahre 1678 einen Unterschied zwischen roten und weißen Muskeln. RANVIER (1873) und KNOLL (1891) bestätigten die Existenz von mindestens zwei Faserarten, die sich neben der Farbe, welche vom Myoglobingehalt des Muskels abhängig ist, noch durch die Kontraktionsgeschwindigkeit und den Gehalt an Mitochondrien unterscheiden.

Nach den Ergebnissen neuerer Untersuchungen unterteilt man heute die Muskelfasern je nach Faserqualität in drei Typen, deren Nomenklatur jedoch nicht einheitlich ist.

OGATA's (1958) Einteilung basiert auf einer unterschiedlichen Succinat-Dehydrogenase-Aktivität; DUBOWITZ und PEARSE (1960) nehmen eine Fasertypisierung anhand der reziproken Unterschiede in der Aktivität der glykolytischen und oxidativen Enzyme vor; ENGEL (1970) klassifiziert die Muskelfasern nach dem Verhalten der myofibrillären ATPase bei einem pH-Wert von 9,4 und ASHMORE und DOERR (1971) benutzen als Unterscheidungsmerkmal die unterschiedlichen Stoffwechseleigenschaften der Fasern (Tabelle I).

KHAN et al. (1973) versuchten ebenfalls eine Einteilung aufgrund der verschiedenartigen Energiegewinnungssysteme der Muskelzellen unter zusätzlicher Berücksichtigung der ATPase-Aktivität:

- Typ I rot : für solche Fasern mit vorwiegend oxidativem Stoffwechsel und schwacher ATPase-Aktivität
- Typ II rot : für jene mit oxidativem und glykolytischem Stoffwechsel und hoher ATPase-Aktivität
- Typ II weiß: für jene mit vorwiegend glykolytischem Stoffwechsel und hoher ATPase-Aktivität

Die Grundlage aller Einteilungsversuche bildet letztlich die Enzymausstattung der Muskelfasern, aufgrund derer unterschiedliche Energiestoffwechselwege eingeschlagen werden können. So besitzen die fibrillenreichen, mitochondrienarmen weißen Muskelfasern sieben mal mehr Glyceraldehydphosphat-Dehydrogenase als die roten Fasern, was sie im Vergleich zu diesen zu einer rascheren Verkürzung befähigt, aber eine schnellere Ermüdung zur Folge hat. Die fibrillenarmen und damit sarkoplasmareichen roten Fasern enthalten dagegen zehnmal mehr Cytochrom c, ein Atmungskettenenzym. Somit überwiegt bei den roten Fasern die oxidative Energiegewinnung mit dem Resultat, daß sie eine größere Ausdauer aufweisen bei einer etwas geringeren Kontraktionsgeschwindigkeit (BARNARD et al., 1971).

Autoren	Jahr	Nomenklatur		
Ogata und Mori	1964	weiß	mittel	rot
Engel	1962	II	-	I
Stein, Padykula	1962	A	B	C
Romanul	1964	I	III	II
Padykula und Gauthier	1967	weiß	intermediär	rot
Yellin und Guth	1970	alpha	beta	alphabeta
Ashmore und Doerr	1971	alpha-w	alpha-r	beta-r
Barnard et al.	1971	fast-twitch white	slow-twitch red	fast-twitch red

Tabelle I: In der Literatur übliche Fasertypenbezeichnung

Eigenschaften

Faserqualitäten

Farbe	weiß	inter- mediär	rot
Zuckungsgeschwin- digkeit	schnell	mittel	schnell
Ausdauer	gering	mittel	groß
Mitochondrien- gehalt	gering	mittel	hoch
Faserdurchmesser	groß	mittel	klein
Myoglobin	wenig	mittel	viel
Myofibrillen	viel	mittel	wenig
Sarkoplasma	wenig	mittel	relativ viel
Enzymmuster	anaerob	aerob u. anaerob	aerob
Lipidgehalt	wenig	mittel	viel
Glykogengehalt	viel	mittel	wenig
Oxidative Enzymaktivität	gering	hoch/ mittel	mittel/ hoch
Glykolytische Aktivität	hoch	gering	mittel
Myofibrilläre ATPase, pH 9,4	stark	stark	schwach
SDH	gering	mittel	stark

Tabelle II: Morphologische und histochemische Typisierung der verschie-
denen Faserqualitäten

2.1.4. Feinbau der Muskelfasern und organspezifische Einrichtungen

a) S a r k o l e m m :

Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, wird in der Literatur der Begriff Sarkolemm nicht einheitlich definiert. Für BARGMANN (1977) stellt es die zweischichtige, innerste Grenzmembran der Muskelzelle dar. Er benutzt die Begriffe Sarkolemm und Plasmalemm synonym, während andere Autoren das Sarkolemm als Kombination, bestehend aus Plasmalemm, Basalmembran, retikulären und kollagenen Mikrofibrillen, betrachten.

b) K e r n e :

Jede Muskelfaser ist ein kernreiches Plasmodium. Die in der embryonalen Muskelfaser anfänglich zentral gelegenen Zellkerne wandern während der Zellreifung in die Faserperipherie. Dort nehmen sie bevorzugt eine unmittelbar subplasmalemmale Lage ein. Ihr Durchmesser variiert zwischen 5 und 16 μm , ihre Gestalt ist überwiegend ellipsenförmig. Die Kerne besitzen ein bis zwei deutliche Nucleoli, eine Doppelmembran, welche oftmals Einkerbungen aufweist und sind gekennzeichnet durch einen nur mäßigen Eu- und Heterochromatingehalt.

c) M i t o c h o n d r i e n :

Im elektronenmikroskopischen Auflösungsbereich lassen sich Mitochondrien als längsovale Organellen in einer Größenordnung von etwa 0,5 - 3 μm : 0,2 - 1 μm bevorzugt in Höhe der I-Bande beiderseits der Z-Streifen nachweisen. Sie liegen parallel zum Faserverlauf zwischen den Myofibrillen. Die Anzahl der Mitochondrien ist abhängig von der jeweiligen Faserqualität. Aufgrund ihres Membransystems gehört die gesamte Mitochondrienpopulation der Muskelfasern zum Cristae-Typ. Biochemisch gesehen repräsentieren die Mitochondrien Multienzymsysteme, wobei unter anderem die Succinyldehydrogenase (SDH) in der Außenmembran lokalisiert ist, die Atmungskettenenzyme in der Lipoproteinmembran der Cristae mitochondriales vorkommen und die Enzyme der β -Oxidation, der oxidativen Decarboxylierung und des Citratzyklusses an den Matrixraum gebunden sind (BARGMANN, 1977).

d) Golgi - Apparat :

Der Golgi-Apparat ist in der Skelettmuskelzelle nur minimal ausgebildet. Kleinste Golgi-Felder, bestehend aus mehreren aufeinandergestapelten, flachen Membransystemen mit internen, vakuolären Erweiterungen und oberflächlichen, vesikulären Abschnürungen, lassen sich vor allem in Kernnähe nachweisen.

Bislang liegen noch keine eingehenden Untersuchungen über die funktionelle Bedeutung dieses synthetisierenden, kondensierenden und formenden Organells für die Muskelzelle vor (BUCHER, 1980).

e) Lysosomen :

Als Lysosomen bezeichnet man bevorzugt in Kernnähe auftretende Gebilde von 0,5 - 2µm Durchmesser. Strukturell läßt sich eine Elementarmembran nachweisen, die den elektronenoptisch dicht erscheinenden Inhalt der Lysosomen vom übrigen Plasma abgrenzt. Ihrer zellulären Funktion entsprechend enthalten diese Verdauungssysteme eine Reihe von sauren Hydrolasen. (z.B. Phosphatasen, Kathepsine, Glukuronidasen, Ribonukleasen u.a.)

Durch Membranschädigungen kann infolge der Enzymfreisetzung eine autolytische Zellzerstörung auftreten.

f) Lipofuszin körnchen :

Am Aufbau dieser gelblichen oder braunen Abnutzungspigmente sind vor allem Proteine und Lipide, aber auch Spuren von lysosomalen Enzymen beteiligt. Dies erklärt sich aus ihrer Entstehung in Autophagolysosomen, von deren Membran sie umschlossen sind. Ihr quantitatives Vorkommen ist positiv alterskorreliert, ihr örtliches Verbreitungsmuster beschränkt sich vor allem auf die Nähe der beiden Kernpole (BARGMANN, 1977).

g) Glykogenpartikel :

Glykogen ist das intrazelluläre Reserve-Kohlenhydrat der Skelettmuskeln. Es durchsetzt die Zelle bevorzugt in der Nähe der Z-Streifen (PAS-Färbung nachweisbar) in Form feiner Granula, sogenannter α -Partikel, die einen Durchmesser von 15 - 30nm aufweisen.

h) Sarkoplasmatische Membransysteme:

Jede Muskelfaser besitzt zwei Membransysteme: ein glattes endoplasmatisches Retikulum, das sarkoplasmatische Retikulum, welches aufgrund seines überwiegend parallelen Verlaufes auch als longitudinales (L-) System bezeichnet wird und in einer strengen räumlichen Beziehung zu den Myofibrillen steht. Ein damit morphologisch nicht kommunizierendes Membransystem, das an der Grenze zwischen I- und A-Bande als schlauchförmige, transversal verlaufende Fortsetzung des Plasmalemmis in das Faserinnere vordringt, ist das T-System.

Die in Längsfaserrichtung orientierten Zytomembranen des L-Systems spannen sich nahezu parallel zwischen den A- und I-Banden eines Sarkomers. Sie bilden in der Mitte des Sarkomers ein netzartiges Geflecht und vereinigen sich an der Grenze zwischen den A- und I-Banden zu transversal zur Myofibrille gerichteten, weiträumigen Kanälchen, den Terminalzisternen. Benachbarte Terminalzisternen sind immer getrennt durch eine quer zur Myofibrille verlaufende, tubuläre Einstülpung des Plasmalemmis, dem T-Tubulus. Diese englumigen, nur transversal anastomosierenden Kanälchen bilden in ihrer Gesamtheit das T-System und stehen in direkter Verbindung mit dem Interzellularraum. Durch diese charakteristische Anordnung ergibt sich das Bild der sogenannten Triaden, worunter man eine dreiteilige Struktur, bestehend aus einem T-Tubulus und zwei ihm eng anliegenden Terminalzisternen versteht.

Die Membranen des L-Systems, welche die querorientierten Auftreibungen der Zisternen begrenzen, weisen an der den T-Röhrchen zugewandten Seite entweder fußchenartige Ausbuchtungen oder ebensolche Einziehungen auf und stellen damit das strukturelle Pendant zu den gleichsinnig geformten T-Tubuli dar. Dadurch wird eine Überbrückung des 10µm breiten Spaltraumes zwischen T- und L-Kanälchen gewährleistet (FRANZINI - ARMSTRONG, 1976).

Das sarkoplasmatische Retikulum hat eine wichtige Funktion bei der intrazellulären Erregungsleitung. Seine Zisternen dienen als Speicherorgan des für die Kontraktionsaktivierung notwendigen Calziums (Konzentration = 10^{-4} mol/l). Hier erfolgt auch die Freisetzung der Ca^{++} -Ionen, welche passiv entlang eines hohen Konzentrationsgradienten die Endbläschen verlassen, während für die Wiederaufnahme des Calziums über

eine calziumaktivierte ATPase ein separater Pool innerhalb des L-Systems existiert (WINEGRAD, 1970). Die T-Tubuli sind das morphologische Äquivalent der elektro-mechanischen Koppelung. Sie dienen der schnellen Fortleitung eines Aktionspotentials von der Zelloberfläche ins Innere der Muskelfaser. Der genaue Mechanismus der Ladungsübertragung von den T- auf die L-Membranen im Triadenbereich ist jedoch unbekannt.

2.1.5. Kontraktiler, regulatorischer und Strukturproteine

Die Masse der gesamten Muskelproteine läßt sich nach funktionellen Gesichtspunkten folgendermaßen aufgliedern: Ein Anteil von etwa 23% besteht aus nichtkontraktilen Zellproteinen, die in Form von Enzymen (Albumine, Globuline etc.) für den Ablauf der chemischen Reaktionen innerhalb der Zelle verantwortlich sind; 20% der Muskelproteine funktionieren als inerte Strukturelemente, welche die übrigen Muskelbausteine in ihrer Lage halten. Diese Stromaproteine bilden zusammen mit den restlichen 57% die wasserunlösliche Proteinfraction. Sie läßt sich nochmals unterteilen in die etwa 50% zählende Masse der kontraktilen Myosin- und Aktinmoleküle und den mengenmäßig am geringsten (wenige % bis 10%) vertretenen Anteil der regulatorischen Proteine (SCHEUNERT, 1987).

Myosin, Aktin, Tropomyosin und Troponin formieren sich, begrenzt durch die Elemente der Z-Scheiben zu gleichmäßigen, funktionellen Einheiten, den Sarkomeren und bewirken durch ihre Anordnung das charakteristische Bild der Querstreifung.

Im Einzelnen besteht der kontraktile Apparat einer Muskelfaser aus einer wechselnden Anzahl dicht gepackter Myofibrillen, die sich ihrerseits wieder aus Myosin- und Aktinfilamenten zusammensetzen. Die Aktinfilamente zweier benachbarter Sarkomere werden an den Z-Scheiben fixiert und in regelmäßiger Ordnung miteinander verknüpft. Da die Sarkomere rechts und links der Z-Scheibe nur aus massenarmen Aktinfilamenten aufgebaut sind, entstehen helle, im polarisierten Licht einfach brechende Bänder, die sogenannten I-Streifen. Die massendichteren Myosinfilamente kommen in der Mitte der Sarkomere zu liegen und bilden

die strukturelle Grundlage der dunklen, anisotropen A-Streifen. Sie erstrecken sich je nach Funktionszustand der Muskelfaser mehr oder weniger ausgedehnt in das Sarkoplasma zwischen die dünnen Aktinfilamente, wobei auf Fibrillenquerschnitten eine hexagonale Gliederung sichtbar wird, das heißt, daß jeweils 6 Aktinfilamente 1 Myosinfilament umgeben (BOURNE, 1960). In der Mitte des A-Streifens befindet sich eine dünne, polarisationsoptisch ebenfalls doppelbrechende Mittelmembran, der M-Streifen. Er besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit quadratischen Maschen, in dem jedes Myosinfilament mit seinen jeweils sechs benachbarten Myosinfilamenten über brückenartige Strukturen verbunden ist (SCHMALBRUCH, 1970). An beide Seiten dieses Mesophragmas grenzt ein schmaler, heller Streifen, das H-Band an. Seine Entstehung ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß in diesem Sarkomerteil die Myosinfilamente keine Köpfchen mehr besitzen (FRANZINI-ARMSTRONG und PEACHEY, 1981).

a) M y o s i n :

Dieses zur Gruppe der Globuline gehörende Protein mit einer maximalen Länge von 156nm ist durch eine kurze Trypsinverdauung in zwei unterschiedliche Moleküle spaltbar. Das Heavy-Meromyosin (HMM) besitzt ein Molekulargewicht von 350.000 und gliedert sich in zwei chemisch verschieden aktive Abschnitte: in der zweigeteilten, sphärischen Kopfregion (Subfragment S1) befindet sich neben dem Aktinbindungsvermögen auch die ATPase-Aktivität, welche die für den Gleitmechanismus essentielle ATP-Hydrolyse katalysiert. Daran schließt sich in einer gelenkartigen Verbindung die Halsregion (Subfragment S2) an, die die notwendige Beweglichkeit für das Zusammenwirken der Aktin- und Myosinfilamente während eines Gleitzyklusses gewährleistet.

Röntgendiffraktometrischen Untersuchungen zufolge liegen sich die Köpfchen paarweise an beiden Seiten des Myofilaments gegenüber. Durch eine Versetzung der stufenweise angeordneten Paare um jeweils 120° entstehen sechs Reihen dieser knopfähnlichen Querbrücken entlang der Myosinfilamente (MOREL und PINSET-HÄRSTRÖM, 1975).

Das Light-Meromyosin (LMM) hat ein Molekulargewicht von 150.000 und bildet das Schwanzstück des Myosins. Es besteht aus zwei ca. 800 Å

langen, α -helikal umeinandergewundenen, fadenförmigen Peptidketten, welche mit dem Subfragment 2 des HMM wiederum gelenkartig verbunden sind. Es wird in regelmäßigen Abständen von der ringförmigen Struktur des sogenannten C-Proteins (Molekulargewicht 140.000) umhüllt, dessen physiologische Bedeutung noch einer Klärung bedarf (HAMM, 1981).

Die Bündelung von etwa 200 eng zusammengelagerten LMM-Schwänzen bildet die axonale Grundeinheit eines dicken Myosinfilaments.

Dadurch, daß die Köpfchen zu beiden Seiten des bipolaren LMM-Bündels in regelmäßigen Abständen seitlich herausragen, entsteht das elektronenmikroskopisch sichtbare Bild der zentralen, kopffreien Region des Sarkomers (HAMM, 1981).

b) A k t i n :

Das Aktin wird aufgrund seiner kugelförmigen Gestalt als Globulär- oder G-Aktin bezeichnet. Es hat ein Molekulargewicht von 46.000 und eine Größe von 56 Å. Etwa 300 bis 400 dieser Monomere polymerisieren unter ATP-Verbrauch zu einem kettenartigen Aggregat, dem F-Aktin. Eine Doppelhelix aus jeweils zwei umeinandergeschlungenen Ketten mit einer Steigung von 59 Å und einer seitlichen Verschiebung der Untereinheiten von 27,5 Å stellt das Grundgerüst der dünnen, isotropen Aktinfilamente dar (SQUIRE, 1981).

c) T r o p o m y o s i n :

Dieses fibrilläre Protein ist ein fadenförmiges Molekül mit einem Molekulargewicht von 70.000 und einer Länge von 400 Å. Es setzt sich aus zwei helicoidal umeinandergewickelten Polypeptid-Fäden zusammen, die in die Rillen der F-Aktin-Doppelspirale so eingebettet sind, daß sie jeweils sieben G-Aktin-Monomere überlagern. In regelmäßigen Abständen von 40nm weist es spezifische Bindungsstellen für das Troponin auf und spielt wie dieses eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktion, weswegen man diese beiden Proteine auch als regulatorische Proteine bezeichnet.

d) T r o p o n i n :

Das Troponin, das dem Tropomyosin alle 40nm angelagert ist, besteht

aus drei globulären Eiweißkomplexen, die alle quantitativ im gleichen Verhältnis zueinander stehen.

Troponin C (TN-C) mit einem Molekulargewicht von 18.000 ist in der Lage, Ca^{++} -Ionen zu binden.

Troponin I (TN-I) mit einem Molekulargewicht von 24.000 hemmt die ATPase-Aktivität des Myosins, indem es die Bindung des Aktins an Myosin blockiert.

Troponin T (TN-T) mit einem Molekulargewicht von 38.000 stellt die Bindung zwischen dem Troponin und dem Tropomyosin her.

Eine Sättigung des TN-C mit Ca^{++} -Ionen hat zur Folge, daß der Hemmeffekt des TN-I genauso aufgehoben wird, wie die sterische Behinderung der Aktin-Myosin-Interaktion, wodurch eine Aktivierung des kontraktilellen Systems stattfindet (HAMM, 1981).

e) N - L i n i e n :

In jeder I-Bande treten zwei N-Linien (N1 und N2) in einer Breite von jeweils 400 - 500 Å auf. Während der Abstand zwischen N1 und der Z-Scheibe mit 0,17 µm konstant bleibt, ist die Entfernung der N2 Linie von der Z-Scheibe vom Kontraktionszustand des Sarkomers abhängig. Immer kommt N2 dabei zwischen N1 und dem der A-Bande benachbarten Ende der I-Bande zu liegen (FRANZINI-ARMSTRONG, 1970). Die genaue chemische Proteinstruktur bedarf ebenso wie ihre physiologische und architektonische Funktion noch einer exakten wissenschaftlichen Erklärung. SQUIRE (1981) nimmt an, daß sich ein funktioneller Zusammenhang herstellen läßt zwischen diesen Stromaproteinen und der Speicherung von Ca^{++} -Ionen.

LOCKER und LEET (1975, 1976b) vertreten die Meinung, daß sogenannte "gap-filaments" existieren, die zwischen den dünnen Aktin- und dicken Myosinfilamenten über die gesamte Länge eines Sarkomers zu liegen kommen und damit nicht nur die N-Linien sondern möglicherweise auch die A-Banden benachbarter Sarkomere miteinander verbinden.

Eine Erklärung für die funktionelle Bedeutung dieser strukturell noch nicht identifizierten G-Filamente steht noch aus. Sie sollen während der Embryonalentwicklung oder während der Kontraktion eine Rolle spielen (LOCKER und LEET, 1976b).

f) Z - S c h e i b e :

6,4% des myofibrillären Gesamtproteins entfallen auf die Eiweißstrukturen der Z-Scheibe.

Die Z-Scheibe hat nicht nur die Aufgabe, die Aktinfilamente zweier benachbarter Sarkomere horizontal miteinander zu verknüpfen, sondern sie stellt auch über filamentäre Brückenbildungen die vertikale Verbindung zwischen zwei auf gleicher Höhe nebeneinanderliegenden Z-Streifen her.

Das als erstes im Jahr 1965 entdeckte, globuläre Z-Scheiben-Protein α -Aktinin hat ein Molekulargewicht von 180.000 und ist aus zwei ähnlichen Ketten aufgebaut. Es besitzt Bindungsstellen für die Anlagerung der Aktinfilamente und ist für die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin mitverantwortlich (SUZUKI et al., 1976; HAMM, 1981).

Im Jahre 1976 wurde das Protein Connectin in der Z-Scheibe der Skelettmuskelfasern identifiziert. Unter Ausbildung langer, parallel zur Faserichtung orientierter Filamente ermöglicht es eine Verkettung der Z-Linien untereinander. HAMM (1981) vermutet, daß es das strukturelle Äquivalent der passiven Elastizität des Muskels darstellt, für welche man bisher keine plausible Erklärung hat.

Zwei Jahre später wurde das mengenmäßig am geringsten vertretene Protein Desmin aus der Z-Scheibe isoliert. Es ist aus Protein-Einheiten vom Molekulargewicht 55.000 aufgebaut und bildet filamentäre Elemente aus, die die Z-Linienperipherie benachbarter Myofibrillen miteinander verbindet und für deren Anheftung an Plasmamembran und Zellorganellen sorgt. Dadurch wird die Stabilität des myofibrillären Gefüges der Muskelzelle erhöht und die Integration der kontraktile Aktionen während eines Kontraktionszyklusses gewährleistet.

2.1.6. Vorgang der Kontraktion

Die wesentlichen Grundzüge der Gleitfilamenttheorie wurden im Jahre 1954 von HUXLEY und unabhängig von ihm im selben Jahr auch von HANSON und NIEDERGERKE dargestellt. Sie beschrieben den Kontraktionsablauf als einen Mechanismus, bei dem sich die Filamente innerhalb der funk-

tionellen Einheit eines Sarkomers kammartig ineinanderschieben. Diese Theorie konnte durch weiterführende Untersuchungen in den folgenden Jahren bestätigt werden. Eine Erklärung für diesen Vorgang, der bis heute Gültigkeit hat, lieferte die Entschlüsselung der chemischen Prozesse, die die Muskelkontraktion als eine Umsetzung von chemischer in mechanische Energie kennzeichnete.

Im Einzelnen läuft der Kontraktionsvorgang nach folgendem Schema ab: Durch einen Nervenimpuls erreicht ein exzitatorisches postsynaptisches Potential die motorische Endplatte und löst eine Depolarisation der von ihr innervierten Muskelzellmembran aus. Die englumigen Tubuli des T-Systems leiten die eintreffende Erregung ins Faserinnere zu den Triaden. Dort bewirkt das Aktionspotential eine Permeabilitäts-erhöhung der Zisternenmembran für Ca^{++} -Ionen. Die Calciumionen verlassen, einem Konzentrationsgefälle folgend (der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt; GREASER, 1977), ihren Speicherort im L-System und erhöhen damit die Ca^{++} -Konzentration in der Muskelzelle von 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l. Jeweils zwei freie Calciumionen müssen von einer der drei Komponenten des Troponins, dem TN-C reversibel gebunden werden, damit die für die Kontraktion erforderliche Aktivierung der kontraktilen Proteine bzw. die Aufhebung der Blockierung durch das Troponin-Tropomyosin-System stattfinden kann (HASSELBACH, 1977). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mg^{++} und ATP hat die Ca^{++} -Bindung an das TN-C auch eine enzymatische Aktivierung der bis zu diesem Zeitpunkt gehemmten Myosin-ATPase zur Folge, wodurch es zu einer raschen Hydrolyse des ATP zum Adenosindiphosphat und zur Bereitstellung von Konformationsenergie für den Gleitvorgang kommt. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, so werden durch den Wegfall der sterisch bedingten Sperrwirkung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes die S1-Bindungsstellen des Myosins in der Tiefe der Aktinrillen freigegeben und die Bindung zwischen dem S1-Anteil und den Aktinmonomeren kann unter einem bestimmten Winkel stattfinden, das heißt, die Abknickung des Myosinmoleküls in den Gelenkregionen des Kopf- und Halsteils aufgrund einer Konformationsänderung des Myosinkopfes und damit das "Filamentgleiten" wird ermöglicht. Die Zugrichtung an den beiden Myosinfilamentenden ist dabei entgegengesetzt, so daß sich der Aktin-Myosin-Überlappungsbereich vergrößert und die I-Bande

an Ausdehnung verliert.

Die Bindung eines neuen ATP-Moleküls bewirkt eine Lösung des Aktin-Myosin-Kontaktes und die für eine normale Verkürzung oftmals notwendige Wiederholung dieser Elementarbewegung kann erneut beginnen, vorausgesetzt, die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration liegt nach wie vor bei 10^{-5} mol/l.

Nach Beendigung des Nervenreizes tritt die Ca^{++} -Ionenpumpe in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums in Aktion und transportiert das Calcium unter ATP-Verbrauch in die longitudinalen Tubuli zurück. Dabei gibt das TN-C das gebundene Ca^{++} wieder ab. Die niedrige extrasarkoplasmatische Calciumionenkonzentration verhindert über die Blockade der Aktin-Myosin-Bindungsstelle durch das wieder in den Vordergrund tretende TN-I die Fortsetzung der Myosin-ATPase-Aktivität und damit der für die Kontraktion erforderlichen Kraftentfaltung (GOLL et al., 1977).

Die Muskelfaser kehrt in den Ausgangszustand zurück, nachdem ein weiteres Molekül ATP die starre Aktin-Myosin-Bindung gespalten hat (Weichmacherwirkung des ATP).

Dem ATP kommen damit zwei Schlüsselfunktionen im Kontraktions-Relaxations-Ablauf zu. Die Muskelzelle sichert sich ihre erforderliche ATP-Konzentration durch eine ständige Resynthese des ATP aus den Spaltprodukten, oder sie bedient sich ihrer Kreatinphosphat-Reserven. Die hierfür nötige Energie wird primär durch den enzymatischen Abbau des Muskelglykogens bereitgestellt (FISCHER et al., 1976).

2.1.7. Energiestoffwechsel der Muskelzelle

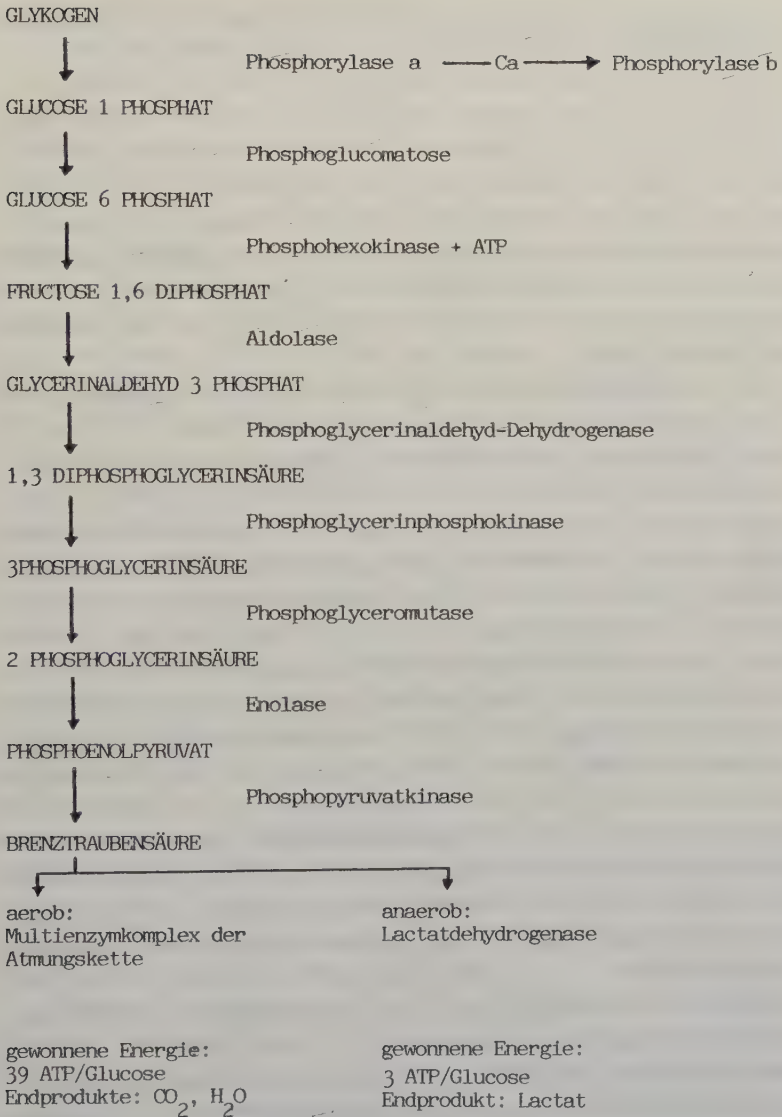
Der sowohl bei der Muskelkontraktion als auch bei der Muskeler schlafung verbrauchte Energieträger, das ATP, muß zur Aufrechterhaltung dieser Vorgänge ständig neu mobilisiert werden. Dies geschieht, indem sich ADP unter Aufnahme von Energie mit einem Phosphat-Molekül verbindet.



Der Muskelzelle stehen, abhängig von ihrer Sauerstoffversorgung, zwei Wege der Energiegewinnung zur Verfügung. Bei ausreichendem Sauerstoffgehalt wird der hauptsächliche Energielieferant, das Muskelglykogen, in den Mitochondrien der Zelle über das System der aeroben Glykogenolyse zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert. Ein Teil der dabei freiwerdenden Energie dient den Mitochondrien über den Vorgang der Atmungsketten-Phosphorylierung zum Aufbau von ATP.

Unter anaeroben Verhältnissen wird das Glykogen enzymatisch zu Lactat abgebaut, welches der weiteren Verstoffwechselung im Körper zugeführt wird. Auch bei dieser anaeroben Glykogenolyse wird Energie frei, wobei allerdings die Ausbeute der aus der gleichen Menge Glykogen gewonnenen Moleküle ATP etwa zwölfmal geringer ist als beim aeroben Abbau. Andererseits steht dieses ATP für die Kontraktion wesentlich schneller zur Verfügung als das in den Mitochondrien erzeugte (HAMM, 1981).

Unabhängig davon, welcher Weg der Energiegewinnung eingeschlagen wird, ist die Anwesenheit von Calcium als regulierender Faktor auch bei dieser Stoffwechselleistung der Muskelzelle die Voraussetzung für eine reibungslose Funktion. (siehe Schema zum enzymatischen Abbau von Glykogen).



Schema zum enzymatischen Abbau von Glykogen (LAWRIE, 1970)

2.1.8. Biochemische und strukturelle Veränderungen von Skelettmuskelgewebe post mortem

2.1.8.1. Rigor mortis

Nach der Tötung eines Tieres setzt früher oder später die Totenstarre, der sogenannte Rigor mortis ein. Dieser ist gekennzeichnet durch den irreversiblen Verlust der Dehnbarkeit eines Muskels (HAMM et al., 1984). Zwei Vorgänge sind hauptsächlich verantwortlich für die Entstehung des Rigor mortis:

1. der pH-Abfall von ca. 7,0 zum Zeitpunkt des Todes bis zu ca. 5,5 am Ende der postmortalen Veränderungen (PENNY, 1980)
2. das Absinken der ATP-Konzentration unter etwa 1 μmol pro Gramm Muskelgewebe.

Beide Faktoren sind speziesunspezifisch und sehr stark temperaturabhängig. HONIKEL et al. (1983) stellten fest, daß bei einer Temperatur von $+38^{\circ}\text{C}$ das Einsetzen des Rigor mortis im Rindermuskel bei pH 6,25 und etwa 2 μmol ATP/g Muskel und bei einer Temperatur von $+15^{\circ}\text{C}$ bei pH 5,25 und 1 μmol ATP/g Muskel erfolgt. Ein maximaler Verlust der Dehnbarkeit wird zwischen $+10^{\circ}\text{C}$ und $+38^{\circ}\text{C}$ bei pH 5,5 bis 5,6 und weniger als 0,5 μmol ATP/g Muskel erreicht. Analoges konnten HAMM et al. (1984) für Schweinefleisch nachweisen. Danach beginnt hier bei einer Temperatur von $+35^{\circ}\text{C}$ bis $+38^{\circ}\text{C}$ die Totenstarre bei einem pH von 6,25, bei einer Temperatur von $+15^{\circ}\text{C}$ dagegen bei pH 6,15 und entwickelt sich zum Bild des vollständigen Rigor mortis bei pH 5,90 ($+35$ bis $+38^{\circ}\text{C}$) bzw. 5,85 ($+15^{\circ}\text{C}$). Die kritische ATP-Konzentration, bei welcher die Rigorentwicklung einsetzt, liegt für Schweinemuskeln etwas höher als für Rindermuskeln.

Folgende Einzelheiten sind bisher über den Mechanismus, der zum Rigor mortis führt, bekannt:

Nach dem Tod des Tieres sistiert aufgrund des Sauerstoffmangels und der unterbrochenen Blutzufuhr die Energiegewinnung über die Atmungskettenphosphorylierung. Entsprechend den Verhältnissen zu Lebzeiten wird zunächst vorhandenes Kreatinphosphat und anschließend die im Mus-

kel einwandfreier Schlachttierkörper vorhandene Glykogenreserve auf dem Wege der anaeroben Glykolyse kontinuierlich zu Lactat abgebaut unter Freisetzung von ATP. Im toten Tier wird dabei im Gegensatz zum lebenden Organismus nicht mehr Glucose, sondern hauptsächlich Glucose-1-Phosphat gebildet und in die Glykolyse eingeschleust (LACOURT und TARRANT, 1983). Das entstandene ATP bildet post mortem ebenso wie intra vitam die energetische Grundlage für die Aktivierung des kontraktile Systems. Zunächst laufen dadurch dieselben Kontraktionsvorgänge ab, wie beim Verkürzungsmechanismus im lebenden Muskel, wobei verbrauchtes ATP bis zu einem pH-Wert von 6,4 über den Glykogenabbau ausreichend resynthetisiert wird. Ein pH-Wert von unter 6,4 führt zu einer teilweisen Resynthese des ATP durch die Adenylatkinase-Reaktion (aus 2 Molekülen ADP entstehen 1 ATP und 1 AMP; AMP wird zu Inosinmonophosphat desaminiert; KIM, 1984). Die Lactatbildung und die damit einhergehende, vermehrte Freisetzung von Protonen ist mit einem fortschreitenden pH-Abfall in der Muskulatur verbunden. Diese stetige Zunahme der Gewebeacidität beeinflusst sowohl die Aktivität der fibrillären ATPasen als auch die der nicht ganz so bedeutenden ATPasen des sarkoplasmatischen Retikulums (BEUTLER, 1977), mit dem Resultat, daß sich im Schweinefleisch bei einem pH-Wert Abfall unter 6,6 ein Aktivitätsmaximum dieser spezifischen Proteasen ausbildet. Ein rascher Glykogenverbrauch und ein Sistieren der ATP-Synthese sind die Folgen, wodurch eine irreversible Verknüpfung der S1-Anteile des HMM mit dem Aktinmolekül entsteht.

Somit sind bei der Ausbildung des Rigor mortis zwei Vorgänge streng voneinander zu trennen: die Muskelkontraktur, welche die strukturellen Voraussetzungen für die Totenstarre schafft und der irreversible Verlust der Dehnbarkeit des Muskels, was dem eigentlichen Eintritt des Rigor mortis entspricht (HAMM et al., 1984).

Die Bedeutung des Calciums bei der Rigorentstehung ist weitestgehend geklärt, wohingegen über die Mechanismen, die zu seiner Freisetzung führen keine einheitlichen Auffassungen existieren. Der Rigor mortis kann sich nur entwickeln, wenn durch einen intrazellulären Konzentrationsanstieg von Ca^{++} -Ionen die Interaktion der Aktin- und Myosinfilamente ausgelöst wird. Da die freigesetzten Ca^{++} -Ionen bei ausreichend

hohem ATP-Gehalt aktiv in die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums zurücktransportiert werden, verbleibt die Ca^{++} -Konzentration im Sarkoplasma zunächst auf einem niedrigen Niveau. Ein Anstieg über 10^{-8} Mol durch die energetisch bedingte Inaktivierung der Calziumpumpe induziert den Eintritt des Rigor mortis (GOLL et al., 1970; BENDALL, 1973). Es bestehen allerdings Zweifel, ob dieser Mechanismus allein verantwortlich ist für den Efflux der Calziumionen. HAMM (1979) diskutiert eine zusätzliche Permeabilitätsänderung der Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums für Calzium unter anaeroben Bedingungen. BUEGE und MARSH (1975) sind der Auffassung, daß der postmortale Efflux von Ca^{++} aus der Matrix der Mitochondrien entscheidend ist für den Anstieg der intrazellulären Calziumkonzentration. Dieser Theorie wird allerdings von BENDALL (1978) widersprochen, da er der Meinung ist, daß die aus den Mitochondrien austretende Menge an Ca^{++} -Ionen zu gering ist für die Entstehung des Rigor mortis. MICKELSON (1983) stellte fest, daß Calzium während Anoxie nicht aus Mitochondrien freigesetzt wird, wenn ATP für die mitochondriale ATPase zur Verfügung steht.

Die strukturellen Auswirkungen des Rigor mortis äußern sich laut PENNY (1980) in einer sterischen Veränderung der Aktin-Myosin-Wechselwirkung und insbesondere in einer irreversiblen Erstarrung der aggregativen Bindungen zwischen Myosin und Aktin als Folge der mangelnden Energiebereitstellung in den Muskelzellen (niederenergetischer Rigorkomplex). HECHT (1987) spricht auch von einer Ausbildung von Quervernetzungen zwischen den dünnen und dicken Filamenten, sobald der ATP-Vorrat im Muskel erschöpft ist.

2.1.8.2 Temperaturabhängige, postmortale Phänomene

a) R i g o r v e r k ü r z u n g :

Das Ausmaß der Muskelkontraktur nach dem Schlachten ist sehr stark von der jeweiligen Temperatur des Muskelgewebes abhängig.

Wird schlachtfrisches Fleisch vor dem Eintritt des Rigor mortis bei Temperaturen über $+20^{\circ}\text{C}$ gelagert, so kommt es zu einer Verkürzung der Sarkomeren, die sich proportional zur Steigerung der Gewebetemperatur

(bis $+37^{\circ}\text{C}$ - 40°C entspricht der Fleischtemperatur unmittelbar nach der Schlachtung) verhält. Diese Form der extremen Muskelverkürzung wird in der Literatur auch als Rigorkontraktur bezeichnet, da sie unmittelbar vor dem Einsetzen des Rigor mortis abläuft. Tritt die Totenstarre in diesem verkürzten Zustand ein, dann kommt es zu einer Zunahme der Aktomyosin-Interaktionen, sprich zu einem höheren Grad an Quervernetzungen (HECHT, 1987). Diese Reaktionskombination - Rigor mortis mit vorausgehender Rigorverkürzung als Resultat einer ungenügenden oder zu langsamen postmortalen Gewebekühlung hat eine hohe Zähigkeit des Fleisches und einen gesteigerten Tropfsaftverlust zur Folge (HAMM et al., 1984; HECHT, 1987). Ein Vergleich von Schweine- und Rindermuskeln zeigt, daß sich die Unterschiede bezüglich der Rigorkontraktur auf den Zeitfaktor beschränken. Während Rindermuskulatur mehr als die dreifache Zeit (über 10 Stunden) benötigt für die Ausbildung der Rigorkontraktur, ist das Ausmaß der Verkürzung dagegen bei beiden Tierarten ähnlich (HAMM et al., 1984).

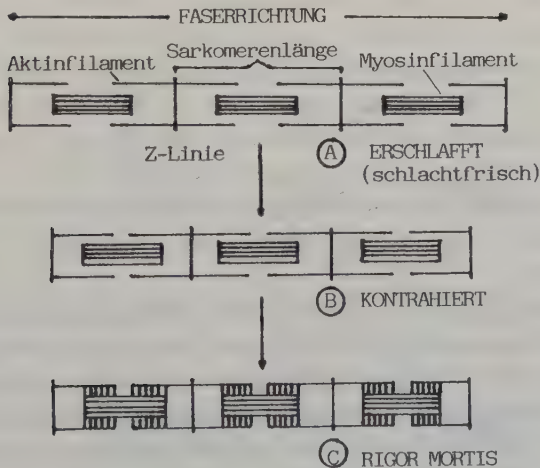


Abb. 1: Schematische Darstellung der nach dem Tod des Tieres eintretenden Veränderungen der Muskelstruktur: Muskelverkürzung (Kontraktur) und Totenstarre (Rigor mortis) - (nach HAMM et al., 1980)

b) Kälteverkürzung:

Muskelgewebe, das vor Eintritt des Rigor mortis rasch auf Temperaturen zwischen $+12^{\circ}\text{C}$ und 0°C abgekühlt wird, zeigt eine Kontraktur, die umso stärker ist, je mehr sich die Temperatur dem Gefrierpunkt nähert. Dieses als Kältekontraktur oder auch als cold-shortening bezeichnete Phänomen setzt im Gegensatz zur Rigorkontraktur schon geraume Zeit (beim Rind bis mehrere Stunden, beim Schwein deutlich eher) vor der Entwicklung des Rigor mortis ein (HAMM et al., 1984). Die Temperaturabhängigkeit des ATP-Abbaues steht dabei in enger Beziehung zum Vorgang der Kältekontraktur, da bei Temperaturen unter $+12^{\circ}\text{C}$ das ATP wesentlich schneller abgebaut wird als im Bereich zwischen $+12^{\circ}\text{C}$ und 20°C (HONIKEL et al., 1981b). Aus Untersuchungen von DRANSFIELD und LOCKYER (1985) geht hervor, daß die Kälteverkürzung einen großen Einfluß hat auf die Zähigkeit des Fleisches, insbesondere dann, wenn die für die Erreichung von $+10^{\circ}\text{C}$ erforderliche Zeit auf 3 Stunden oder weniger abnimmt. Dies hat seine Ursache in der höheren Zahl von Quervernetzungen, welche in kältekontrahierten Muskelfasern immer vorliegen. Betroffen sind vor allem die gap-Filamente im Bereich der I-Bande. Sie sind durch die Überlappung der Filamente beim kälteverkürzten Muskel nicht mehr frei und können nicht mehr abgebaut werden (LOCKER, 1983). Deshalb, und weil im verkürzten Muskel die Reifung in demselben Ausmaß abläuft, wie im unverkürzten, wird der kontrahierte Muskel nach einer gewissen Reifungszeit zäher sein als der unverkürzte (HECHT, 1987).

Morphometrisch wird eine Verkürzung des Muskels auf die Hälfte seiner ursprünglichen Länge bei einer Kühlung von 0°C erreicht (LOCKER und HAYGARD, 1963).

Der auslösende Faktor der Kältekontraktur liegt analog zur Muskelverkürzung intra vitam in einer Erhöhung der sarkoplasmatischen Ca^{++} -Ionenkonzentration. Die Konzentrationserhöhung bleibt allerdings post mortem erhalten, da zum einen die Calzium-Pumpe, welche die aus dem SR ausgetretenen Ca^{++} -Ionen wieder zurücktransportiert, bei niedrigen Temperaturen ihre volle Funktionsfähigkeit verliert und zum anderen unter den vorliegenden anaeroben Bedingungen zusätzlich Ca^{++} -Ionen aus den Mitochondrien freigesetzt werden (HAMM, 1979).

Obwohl dunkle (rote) Muskeln aufgrund ihrer größeren Anzahl an Mito-

chondrien und dem damit verbundenen höheren Efflux an Ca^{++} -Ionen eher zum cold-shortening neigen als helle (weiße), konnte BENDALL (1978) nachweisen, daß Kältekontraktur auch in der hellen Muskulatur von Schweinen auftritt. Er führte dies auf das wesentlich bessere Ca^{++} -Akkumulationsvermögen des SR der hellen Muskulatur zurück. Dabei besteht sowohl beim Rind als auch beim Schwein eine hohe positive Korrelation zwischen der Inkubationstemperatur des Fleisches und seinem Mitochondriengehalt, das heißt, je heller der Muskel ist, desto niedrigere Temperaturen sind notwendig für den Eintritt der Kältekontraktur (FISCHER et al., 1980).

HONIKEL und HAMM (1978a) stellten fest, daß Kältekontraktion die Geschwindigkeit der Abbauvorgänge im Muskel steigert. Die Folge sind ein Anstieg des R-Wertes (=Maß für den Abbau von ATP zu IMP, ausgedrückt als Verhältnis der Extinktionen eines mit Phosphatpuffer verdünnten Extraktes bei 250 zu 260nm) und der Lactatbildung während der Lagerung bei niedrigen Temperaturen (FISCHER et al., 1980).

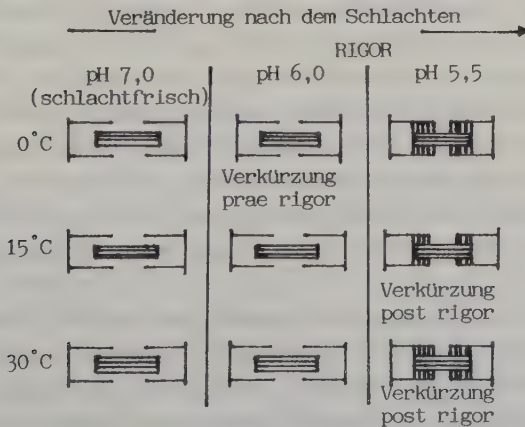


Abb. 2: Schema des Temperatureinflusses auf die Verkürzung des Muskels post mortem: Kältekontraktur (oben) und Rigorkontraktur (unten) - (nach HAMM et al., 1980)

Aufgrund der energieverbrauchenden Kältekontraktur ist somit ein schneller Abfall des pH-Wertes in den ersten 4 Stunden nach der Schlachtung zu beobachten, während der pH-Abfall am Ende dieses Prozesses erwartungsgemäß wieder in eine langsamere Phase eintritt (KIM, 1984).

c) T a u - R i g o r :

Wird schlachtwarmes Muskelgewebe kleinerer Schlachtkörper vor Eintritt des Rigor mortis gefroren, so kommt es beim Auftauen zu einer intensiven Muskelverkürzung. Diese wird hervorgerufen durch einen Efflux von Ca^{++} -Ionen aus dem SR während des Einfrierens oder im Augenblick des Auftauens (BENDALL, 1973). Es wird vermutet, daß die Membranen des SR durch den Gefriervorgang so verändert werden, daß Calciumionen entweder schon beim Einfrieren oder aber erst beim Auftauen (welche dieser Möglichkeiten zutrifft ist noch ungeklärt) in die myofibrillären Räume austreten können (WHITING und RICHARDS, 1978). Dadurch wird der Mechanismus des Filamentgleitens durch eine Aktivierung der Myosin-ATPase in Gang gesetzt, wobei die Geschwindigkeit des ATP-Turnover aufgrund einer entsprechend schnellen Glykolyse mit steigender Temperatur zunimmt.

Das Phänomen des Tau-Rigor wird bis zu einem ATP-Gehalt von $0,1 \mu\text{Mol/g}$ Gewebe beobachtet; darunter ist keine Kontraktur möglich (DAVEY und GILBERT, 1976). Die genaue Kenntnis der Tau-Rigor-Temperaturkurve ermöglicht eine Vermeidung dieses unerwünschten, mit hohem Saftaustritt und großer Zähigkeit einhergehenden Vorganges: man mußte dazu das auf -12°C gefrorene Fleisch so lange lagern, bis das ATP fast vollständig abgebaut ist und dann erst auf Temperaturen unter -20°C kühlen, da in diesem Temperaturbereich der ATP-Abbau weitgehend gehemmt ist (HAMM, 1979).

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß mit steigender Auftautemperatur (von $+3^\circ\text{C}$ bis 37°C) sowohl die Entwicklungsgeschwindigkeit als auch die Intensität des Tau-Rigor zunehmen (OKUBANO und STOUFFER, 1975). Daraus läßt sich folgern, daß der Tau-Rigor einem anderen Mechanismus unterliegt als die Kältekontraktur und nicht als eine Umkehrung des cold-shortening verstanden werden darf.

2.1.8.3 Post-Rigor-Mechanismen (Fleischreifung)

Die Reifungszeit des Fleisches, das heißt, die Zeit gerechnet vom Lösen des Rigor mortis bis zum Erreichen der optimalen Zartheit der Muskulatur variiert bei gleicher Ausgangssituation bezüglich des Schlachtvorganges je nach Tierart beträchtlich. So vollzieht sich die Reifung in Geflügelfleisch am schnellsten, in Schweinefleisch etwas langsamer und in Rind- Kalb- Schaf- und Kaninchenfleisch ohne wesentliche Zeitunterschiede am langsamsten (PENNY, 1980).

Die genauen Zeiten für die Reifung von Schweinefleisch ermittelten VANA et al. (1982). Danach dauert diese Phase bei $+4^{\circ}\text{C}$ 2-7 Tage und bei $+37^{\circ}\text{C}$ 1-6 Stunden. Für die Fleischwirtschaft bedeutet das, daß ein Kompromiß eingegangen werden muß zwischen der Forderung nach bestmöglicher mikrobiologischer Hygiene und der Forderung nach der größtmöglichen Zartheit des Fleisches. Der Eintritt der sogenannten Lysis (=Lösung der Rigorkomplexe und damit Abnahme des Spannungszustandes in der Muskulatur) wird bereits während der Ausbildung des Rigor mortis vorbereitet, da schon in dieser Phase des pH-Abfalles und des ATP-Verbrauches abbauende Vorgänge im Muskelgewebe einsetzen. Dabei kommt es zur Freisetzung pH-Wert- und temperaturabhängiger Proteasen aus den Lyosomen und aus vakuolig degenerierten Mitochondrien (VANA, 1982; HECHT, 1987). Diese Enzyme spalten die Proteinmoleküle an ganz spezifischen Stellen. Sie brechen damit die geordnete Quer- und Längsvernetzung der Muskelfilamente in den Fibrillen auf, ohne die Aktomyosin-Querbrücken zu lösen. Der Lysisevorgang entspricht also keiner Rückgängigmachung des Rigor mortis oder einer Erschlaffung post contractionem, sondern stellt eine irreversible Frakturierung der Myofibrillen insbesondere im Bereich der Z-Linien dar.

Die Proteolyse aufgrund der lysosomalen Desintegration und auch aufgrund der Aktivitätszunahme freigewordener mitochondrialer Enzyme betrifft zunächst nur intrazelluläre Proteinstrukturen. Vor allem Veränderungen der Myosin-Aktin-Wechselwirkung, die sich in einer Schwächung der aggregativen Bindungen zwischen den beiden Proteinen als Folge von Veränderungen der elektrischen Aufladung äußert (IKEUCHI et al., 1980), Zerfall der Z-Linien-Struktur, mangelndes Anhaftungs-

vermögen von Proteinen an der Z-Scheibe, Abbau der myofibrillären Proteine verbunden mit Fragmentierung der Myofilamente und Zunahme der Löslichkeit myofibrillärer Proteine sind zu nennen (PENNY, 1980). Ein Einfluß der Fleischreifung auf die Intensität der α -Aktininauslösung aus der Z-Linie konnte nicht festgestellt werden (PENNY, 1980).

Extrazelluläres Bindegewebe wird erst dann abgebaut, wenn das Plasmalemma der Muskelzellen durchlässig geworden ist für die proteolytischen Enzyme, was erst nach einigen Tagen post mortem der Fall ist (HECHT, 1987).

Das Vorkommen der einzelnen Proteasen ist zum Teil tierartspezifisch unterschiedlich. So konnten von den vier bekannten Kathepsinarten (A, B, D, L) im Rindfleisch eine, im Schweinefleisch zwei und im Geflügelfleisch alle vier Proteasen nachgewiesen werden (OKITANI, et al., 1980; HECHT, 1987). Besondere Bedeutung kommt dabei dem Kathepsin D zu, für welches VENUGOPAL und BAILEY (1978) zeigen konnten, daß zu seiner Aktivierung nur sehr niedrige Energiebeträge nötig sind.

Im Einzelnen ist die Zuordnung der Proteasen zu den jeweiligen myofibrillären Proteinanteilen noch nicht restlos geklärt. Als erwiesen gilt, daß CAF (=Calzium aktivierter Faktor), ein proteolytisches Enzym mit einem Molekulargewicht von 110.000, welches bei physiologischen pH-Werten durch Calziumionen aktiviert wird, für den Abbau des Troponin T verantwortlich ist (PARRISH, 1978; PENNY, 1980) und eine geringe Proteolyse des Tropomyosins verursacht (PARRISH, 1978). Das elektrophoretische Auftreten einer 95.000-Dalton-Komponente während einer 14-tägigen Fleischlagerung bei +2°C wurde von DUTSON und YATES (1978) als Abbau des Myosinmoleküls interpretiert, während KOCHMARAIIE et al. (1984) zwar zu gleichen Ergebnissen kamen, aber noch keine Erklärung haben für die Herkunft dieser Komponente. Sie konnten außerdem das schrittweise Auftreten einer 110.000-, 30.000- und 55.000-Dalton-Komponente und das Verschwinden von Desmin, Troponin T und C nachweisen und zeigten in ihren Untersuchungen, daß keine gravierenden biochemischen Unterschiede bestehen in der Reifung normal gekühlter und kaltekontrahierter Muskulatur.

Das Ende der postmortalen Reifungsvorgänge ist gekennzeichnet durch die Stabilisierung des pH-Wertes bei 5,7 - 5,9, eine Inaktivierung

der mitochondrialen Enzyme, eine Abnahme der Proteolyse und das Erreichen des arttypischen Fleischaromas (VANA et al., 1982).

2.2. Der Gefriervorgang und seine Auswirkungen auf das Muskelgewebe

Das Gefrieren als konservierende Maßnahme dient in der Fleischindustrie zur Aufrechterhaltung der Fleischqualität über einen längeren Zeitraum. Mikrobielles Wachstum soll dadurch verringert und biochemische sowie strukturelle Veränderungen auf ein Minimum reduziert werden (HONIKEL, 1983).

Um möglichst optimales Kühlen, Gefrieren und Auftauen von Fleisch mit geringen ernährungsphysiologischen und sensorischen Verlusten bzw. qualitätsmindernden Veränderungen zu gewährleisten, ist es erforderlich, die physikalischen Vorgänge beim Ablauf des Gefrier- und Auftauprozesses zu kennen und entsprechend zu berücksichtigen.

2.2.1. Physikalische Grundlagen des Gefriervorganges

Die Voraussetzung für den Beginn des Gefriervorganges ist Nukleation. Für reines Wasser gilt, daß der Gefrierprozess bei Anwesenheit eines Kristallisationskernes (bestehend aus Eis) bei Temperaturen geringfügig unterhalb des Gefrierpunktes einsetzt, während das Fehlen solcher Eiskristalle die Temperatur des Gefrierbeginns auf -39°C erniedrigt (=homogene Nukleation).

Wasser, das mit "Fremdkörpern", das heißt, mit wasserunlöslichen anorganischen und/oder organischen Partikeln angereichert ist, gefriert im Temperaturbereich zwischen etwa -6°C und -25°C , da gelöste Partikel zu einer Absenkung des Gefrierpunktes und somit zur Unterkühlung (supercooling) des gesamten biologischen Systems führen. Bei diesem als heterogene Nukleation bezeichneten Prozeß können die Fremdsubstanzen als Kristallisationskerne fungieren (DE QUERVAIN, 1975).

Das weitere Wachstum der Eiskristalle hängt von der Zufuhr von H_2O -

Molekülen aus der flüssigen Phase und von der Ableitung der freiwerdenden Wärme des gefrierenden Systems ab. Das Eiskristall-Wachstum erfolgt schrittweise, wobei folgende Stufen durchlaufen werden: thermisches Dendriten-Wachstum; Wiederschmelzen der thermischen Dendriten in tieferen Lagen mit gleichzeitiger Konsolidierung der Struktur an der Gefriergrenze; anschließendes Wachstum von säulenförmigen Kristallen in Folge einer Unterkühlung (GOMEZ und CALVELO, 1982). Die mittlere Größe der Kristallsäulen korreliert unabhängig von der Nukleations-Temperatur mit R (Geschwindigkeit der Wanderung der Grenzfläche) und G (Temperaturgradient an der Oberfläche der flüssigen Seite), (GOMEZ und CALVELO, 1982).

Im Muskelgewebe, das bis zu 75-80% aus Wasser besteht, folgt der Gefriermechanismus den Gesetzen der heterogenen Nukleation und beginnt bereits knapp unterhalb von -1°C .

Zahlreichen Untersuchungen zufolge existiert in allen biologischen Systemen eine Wasserfraktion, die in keinem Temperaturbereich in die Eisphase transformiert werden kann (DUCKWORTH, 1971; HASL und PAULY, 1971). Es handelt sich dabei um "gebundenes Wasser", welches enge Bindungen mit den polaren Gruppen von Biopolymeren eingeht (SIMATOS und TURC, 1975). Diese Wasserfraktion ist völlig unbeteiligt am Wärmeaustausch des Gewebes während der Abkühl- und Wiedererwärmungsphase.

Weitere fundamentale physikalische Prozesse, die während des Gefrierens ablaufen und entscheidende Einflüsse auf biologische Gewebe haben können, sind neben der Eiskristallbildung und der daraus resultierenden mechanischen Gewebealteration vor allem die Konzentrationsänderung der intra- und interzellulären Flüssigkeit durch Elektrolytaustritte aus den Zellen mit nachfolgender Zelldehydratation, außerdem thermische Wechselwirkungen (RUBINSKY et al., 1980) und osmotische Spannungen (MERYMANN, 1971).

2.2.2 Einfluß der Gefriergeschwindigkeit auf biologische Systeme

Die Konsequenzen, die sich aus dem Gefrierprozeß für biologische Gewebe ergeben, sind sehr stark von der Geschwindigkeit der Temperatur-

absenkung und der endgültigen Lagertemperatur abhängig. So beschränkt sich die Lokalisation der Eiskristalle bei einer langsamen Gefrierzeit von etwa 30 Minuten und darüber bei Skelettmuskulatur ausschließlich auf das extrazelluläre Medium. In dieser Zeit t (=Zeit, die benötigt wird, um Muskelgewebe von -1°C auf -7°C abzukühlen) gefrieren 80% des ausfrierbaren Wassers (FRANKS, 1985).

RAHELIC und PUAC (1985) konnten zeigen, daß Eiskristalle in bei -10°C gefrorenen Muskeln nur interzellulär auftreten. Das Wachstum der extrazellulären Eiskristalle sistiert bei einem Maximum und ist auch durch weitere Senkung der Gefriereschwindigkeit nicht steigerbar (CALVELO, 1981).

Die Eisbildung im extrazellulären Raum hat ihre Ursache in den unter 2.2.1. geschilderten Mechanismen, das heißt, zunächst kristallisiert nur reines, außerhalb der Zelle befindliches Wasser. Den gelösten Molekülen wird dadurch das Lösungsmittel entzogen, es kommt zu einem Anstieg der Ionenkonzentration. Gemäß den osmotischen Gesetzen diffundiert Wasser entlang des Konzentrationsgradienten vom Intra- in den Extrazellulärraum, um einen Konzentrationsausgleich zu schaffen. Der H_2O -Efflux unterstützt das Wachstum der extrazellulären Eiskristalle, indem sich die Wassermoleküle an den bereits vorhandenen Kristallen niederschlagen. Das morphologische Resultat dieses Dehydratationsprozesses ist eine Schrumpfung der Fasern (HAMM, et al., 1982).

Beschleunigt man die Gefriereschwindigkeit auf $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-10^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ (MOOR, 1964) so ändert sich dagegen der Durchmesser der Muskelfasern kaum, da die Acceleration eine Kryosynärese unmöglich macht. Das bedeutet, daß es bei einer raschen Abkühlung des Gewebes den Zellen nicht möglich ist, die Wasserabgabe durch Diffusion der Gefriereschwindigkeit anzupassen. Ein extrazellulärer Konzentrationsausgleich kann somit nicht stattfinden und es kommt zusätzlich zur Bildung extrazellulärer Eiskristalle zur intrazellulären Kristallisation. Die Größe der intrazellulären Eiskristalle verhält sich dabei proportional zur Lagerdauer (CALVELO, 1981) und umgekehrt proportional zur Gefriereschwindigkeit, das heißt, bei Gefrieren mit mittlerer Geschwindigkeit treten relativ große Kristalle auf und bei schneller Abkühlung kommt es bevorzugt zur Bildung kleiner, feinkörniger Kristalle (RAHELIC und PUAC, 1985).

Aus noch unerklärlichen Gründen wachsen die intrazellulären Eiskristalle immer longitudinal in Richtung der Muskelfaserachsen und erreichen ihr maximales Wachstum bei $t_c = 20$ Minuten (FRANKS, 1985). Die Bildung von intrazellulärem Eis ist in der Regel unter gewerblich üblichen Verfahren nur an der Oberfläche von Geweben bis zu einer Tiefe von 1-2 cm nachweisbar, da die Gefriereschwindigkeit an der Oberfläche eines Fleischstückes größer ist als in seinem Inneren (FRANKS, 1985). Prinzipiell läßt sich aus dem Verhalten dieses Geschwindigkeitsgradienten (je tiefer die Kühltemperatur, desto geringer der Gradient) die Beziehung ableiten, daß mit sinkender Kühltemperatur die Dicke der Oberflächenschicht, in welcher intrazelluläre Eisbildung eintreten kann, zunimmt (HAMM et al., 1982).

Eine Erhöhung der Gefriereschwindigkeit bis auf Werte von -100°C pro Sekunde führt zu einer homogenen Nukleation mit amorpher Verfestigung des Zytoplasmas, da hierbei die Voraussetzungen für die Unterkühlbarkeit der Zellen geschaffen werden. Bei dieser als Vitrifikation bezeichneten Methode soll es nicht zum Auftreten von Kristallen kommen. Die Anordnung von Teilchen bis zu einer Größenordnung von $10\text{-}20\text{\AA}$ folgt einem gleichmäßigen Verteilungsmuster, wobei Kristallteilchen unterhalb dieses Auflösungsbereiches unerkant bleiben (GROSS, 1977).

In der Fleischtechnologie ist dieses Verfahren nicht anwendbar, da die Grenzen der Objektanmessungen derzeit bei maximal $0,5\text{mm}$ liegen. Es wird hauptsächlich in Form der Gefrierätzung auf dem Gebiet der Zellmorphologie angewendet.

2.2.3. Schädigungen durch Gefriereinwirkung

Beim langsamen, praxisüblichen Gefrieren mit ausschließlich extrazellulärer Eisbildung dominiert als Schadensfaktor die Dehydratation der Zellen. Durch die osmotische Wanderung des Wassers in den Extrazellularraum entsteht eine Verminderung des zellulären Volumens bis zu einem zellspezifischen Grenzwert, welcher von MERYMAN (1970) als das "minimale tolerierbare Zellvolumen" bezeichnet wird. Ab diesem Wert bleibt

zwar das Zellvolumen konstant, aber der steigende hydrostatische Druck und mechanische Beanspruchungen können zu einer Überdehnung und Desintegration der Membranen führen (MERYMAN, 1968).

Da sich an den Membranen essentielle zelluläre Stoff- und Energietransfers abspielen, ist es nicht verwunderlich, daß MORRIS und CLARKE (1981) auch noch postmortal die Dysfunktion der Membranen als primäre Ursache der Frostschäden ansehen.

FRANKS (1985) konnte zeigen, daß der Vorgang der Zelldehydratation unabhängig davon, ob die Zellmembranen zerstört wurden oder nicht, teilweise reversibel ist, da beim Auftauen eine gewisse Menge Wasser von den Zellen reabsorbiert wird.

Nicht nur die Zellmembranen, sondern auch die sehr empfindlichen Mitochondrienmembranen werden durch den Entzug von Wasser aus der Zelle während des langsamen Einfrierens geschädigt (HAMM und GOTTESMANN, 1985). Die Autoren folgern dies aus ihren Untersuchungsergebnissen, in denen sie im Sarkoplasma der Muskelzellen von Rind und Schwein eine Aktivitätserhöhung der Mitochondrien-Enzyme Liponamiddehydrogenase (LIPDH), Citratsynthase (CS) und β -Hydroxylacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) nach Gefrieren bis -20°C bei langsamer Geschwindigkeit feststellen konnten. Alle drei Enzyme sind an die innere Mitochondrienmembran gebunden und ihre Aktivitätszunahme im Zytoplasma kann somit als Maß für die Membranalteration angesehen werden.

Die Lagerdauer des langsam gefrorenen Fleisches hat Untersuchungen von HAMM et al. (1982) zufolge keine wesentlichen Auswirkungen auf die myofibrillären Proteine. Sie konnten selbst bei monatelang gefrier-gelagerten Rindfleischstücken keine Denaturierung des Muskeleiweißes durch Gefrieren nachweisen. Die Autoren stellen damit die häufig diskutierte Schädigung der intrazellulären Muskelproteine durch die Konzentrationserhöhung der muskelspezifischen Salze im nicht ausfrierbaren Anteil der Gewebeflüssigkeit zumindest während kürzerer Gefrierlagerung in Frage.

Außer Frage steht dagegen, daß die sogenannten "Lösungseffekte", insbesondere die Konzentrationserhöhung der interstitiellen Flüssigkeit und die chemischen Potentialunterschiede (FAHY, 1981) bevorzugt die

Zellmembranen schädigen (LEIBO et al., 1970).

Ein weiterer Mechanismus, der für den Integritätsverlust der Zellmembranen verantwortlich sein könnte, wird von LEVITT (1962) diskutiert. Er vermutet, daß es aufgrund des verringerten Proteinabstandes, der aus der Dehydrierung resultiert, zu anomalen Disulfid-Brückenbindungen durch Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen oder durch Disulfid-Austausch kommt mit anschließender, irreversibler Strukturveränderung.

Die beschriebenen biochemischen und mikrostrukturellen Veränderungen manifestieren sich fleischtechnologisch unter anderem in einem verminderten Wasserbindungsvermögen und einer verringerten Fett-Emulgierungskapazität (SIKORSKI, 1978).

Beim mittleren und schnellen Gefrieren ist als zusätzlicher Schadensfaktor die intrazelluläre Eisbildung zu nennen, durch welche die Zelle versucht, den Gleichgewichtszustand trotz des undurchführbaren Wassertransportes aufrecht zu erhalten. Untersuchungen von RAHELIC und PUAC (1985) zeigen, daß die intrazelluläre Eisbildung bei -22°C gefrorenen Muskelproben nur im Bereich der I-Banden, bei -33°C gefrorenen Proben dagegen sowohl in den I- als auch in den A-Banden auftritt. Sie erklären ihre Befunde damit, daß in den I-Banden nur das Aktin lokalisiert ist, welches einen verhältnismäßig hohen Anteil an unpolaren Resten besitzt und Wasser nur schwach bindet, während das Myosin in den A-Banden viele polare Reste aufweist und somit ein hohes Wasserbindungsvermögen besitzt.

Die intrazellulären Eiskristalle bewirken eine Membranschädigung, die umso stärker wird, je höher die Einfriergeschwindigkeit ist (HAMM und GOTTESMANN, 1983). Dabei ist nicht nur die Begrenzung der Zelle, sondern auch die der Mitochondrien betroffen. Die Mitochondrienmembran erleidet durch die sarkoplasmatische Kristallbildung Deformationen (MEIER, 1983) und mechanische Verletzungen in Form von Integritätsverlusten (HAMM et al., 1982).

HAMM et al. (1982) nehmen sogar an, daß Eis bei entsprechend hoher Ge-

friereschwindigkeit in der Mitochondrienmatrix kristallisiert. Sie lassen dabei offen, ob diese zusätzlich eintretende Membranschädigung auf mechanische Insulte oder auf den verstärkten Entzug von Wasser aus der Membran in Nachbarschaft des Eises zurückzuführen ist. Die Freisetzung der intramitochondrialen Enzyme (LIPDH, CS, HADH) und damit ihre meßbare Aktivität ist jedenfalls bei intrazellulärer Eisbildung signifikant höher als bei extrazellulärer Kristallisation.

Die Einflüsse der Kälteeinwirkung auf Muskelgewebe lassen sich nicht ohne Berücksichtigung des Auftauvorganges diskutieren. Besonders die Schwierigkeiten beim Feststellen des genauen Zeitpunktes des Schadenseintrittes und die Beteiligung von Rekristallisationsprozessen machen eine Betrachtung des Auftauvorganges unter dem Aspekt seiner essentiellen Mitbeteiligung am Gefrier-Auftau-Zyklus notwendig.

Beim Schmelzen von Eis spielen sich an der instabilen Grenzfläche zwischen flüssig und fest in reziproker Form größtenteils dieselben physikalischen, chemischen und osmotischen Mechanismen ab wie bei der Eiskristallbildung mit vergleichbarer destruktiver Wirkung auf die Zellstrukturen durch mechanische Schädigungen und Permeabilitätsimbilanzen. Grundsätzlich gilt, daß zwischen dem Schadensausmaß durch Auftauen und der Auftaugeschwindigkeit eine Proportionalität besteht, die sich daraus ergibt, daß das eventuelle Auftreten eines kompensatorischen Wachstums der Eisstrukturen in der Rekristallisationsphase mit zunehmender Auftauzeit ansteigt (DILLER et al., 1972).

Eine weitere Korrelation besteht zwischen der Wirkung der Auftaugeschwindigkeit und der Gefriereschwindigkeit (HAMM et al., 1982).

So schmelzen bei rasch gefrorenem und rasch aufgetautem Fleisch die feinkörnigen Eisstrukturen innerhalb und außerhalb der Zelle in kurzer Zeit und die entstehenden Flüssigkeitströpfchen werden vom Gewebe resorbiert, ohne daß eine bedeutende Menge Fleischsaft austritt. Korrespondiert die Auftaugeschwindigkeit dagegen nicht mit der Gefriereschwindigkeit, dann entsteht in jedem Fall eine gesteigerte Tausaftbildung, da entweder infolge der einsetzenden Rekristallisierung ein Kristallwachstum mit nachfolgender Zellschädigung einsetzt (siehe Abb. 3, 2'), oder aber die Zeit nicht ausreicht, um die großen Mengen schnell

aufgetauter Flüssigkeit vollständig aufzunehmen (siehe Abb. 3 , 3').

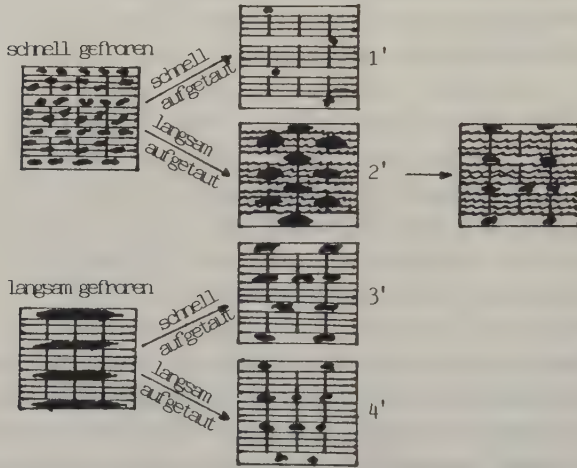


Abb. 3: Einfluß der Auftaugeschwindigkeit auf die beim Auftauen von sehr rasch und langsam eingefrorenem Fleisch abgesonderte Tausaftmenge (schematisch). - (nach HAMM et al., 1982)

Auch GONZALES-SANGUINETTI et al. (1986) kamen zu dem Ergebnis, daß die Tausaftbildung die Folge einer unvollständigen Wiederaufnahme des extrazellulären Wassers ist und auf unsachgemäß durchgeführten Gefrier- und Auftauprozessen beruht.

Aus mikromorphologischer Sicht sind die größten Schadwirkungen bei schnell gefrorenem und schnell aufgetautem Muskelgewebe zu erwarten (MEIER, 1983). Sie dokumentieren sich in einer Deformation der Mitochondrienmatrix, Fragmentierung der T-Tubuli, Ordnungsverlust der Aktinfilamente in den I-Banden und Umfangsvermehrung der Z-Linien.

2.3. Bedeutung der Lektine und ihr Einsatz in der Muskelforschung

Aus bisherigen Forschungsergebnissen geht hervor, daß Lektine die vielfältigsten Aufgaben innerhalb des Zellaufbaus, des Zellstoffwechsels und der Interaktion mit anderen Zellen erfüllen, von denen längst noch nicht alle bekannt sind. GOLDSTEIN (1980) vermutet, daß die Lektine als Proenzyme (Proteasen?) fungieren können, oder auch eine Schutzfunktion gegenüber schädigenden Einflüssen ausüben können. Fest steht, daß sie aufgrund ihrer hohen Affinität zu Kohlenhydratresten fähig sind, die Kommunikation und Adhäsivität der Zellen zu vermitteln, ferner, Zellen toxisch zu schädigen, Lymphozyten zu stimulieren und Zellen mit bestimmten Membranglykoproteinen zu agglutinieren (GEROK, 1985). Besonders letztere Eigenschaft macht sie zu einem wertvollen Hilfsmittel für die Identifizierung und histologische Differenzierung verschiedener Zellen.

Ihr Einsatz als agglutinierende Tracer-Moleküle erstreckt sich inzwischen auf zahlreiche Gebiete der Wissenschaft: in der Hämatologie dienen sie zur Blutgruppentypisierung, in der Biochemie zur Erkennung von Zelloberflächenantigenen, in der Tumorforschung zur Unterscheidung normaler und transformierter Zellen (LIENER et al., 1986), um nur einige Beispiele zu nennen.

Auch in der Muskelforschung wurden in den letzten Jahren verstärkt Lektine eingesetzt.

CERI et al. (1985) beschäftigten sich mit der Frage, ob Unterschiede existieren in der Synthese, Verteilung und Funktion endogener Lektine während der Myogenese gesunder und dystrophischer Küken. Sie stützten sich dabei auf die Befunde der Autoren DEN et al. (1976), GARTNER et al. (1975), KAUFMANN et al. (1980) und MAC BRIDE (1980). Diese konnten schon vor Jahren eine temporäre Korrelation zwischen dem Auftreten von Lektinen und der Myoblasten-Fusion nachweisen, ohne die Rolle der Lektine dabei im Einzelnen klären zu können. Die Resultate von CERI et al. (1985) ergaben, daß sich die beiden auf ihr physikalisches Verhalten und ihre Kohlenhydrat-Spezifität untersuchten Lektine (β -D-Gal-Lektin und Leber-Lektin) in gesunder und dystrophischer Muskulatur völlig identisch verhalten.

CAPALDI et al. (1984) versuchten, grundsätzlich das Bindungsverhalten von Lektinen in menschlicher Skelettmuskulatur zu klären und fanden heraus, daß neben der Wahl des Lektins die Beschaffenheit der Lektinlösung (Lektin-Biotin-Mischung = indirekte Methode, Lektin-HRP-Konjugat = direkte Methode) großen Einfluß hat auf die Kontrastierung und die Farbintensität der als Farbreaktion ablaufenden Wasserstoffbrückenbildung zwischen dem Lektin und dem entsprechenden Saccharid. Von den 15 von ihnen getesteten Lektinen (siehe Tabelle III) zeigten 4 (BSA II, DBA, LPA und SBA) ein insgesamt negatives Färbeverhalten; bei den anderen 11 Lektinen war eine oft signifikant unterschiedliche Bevorzugung bestimmter Zellbestandteile zu beobachten, wobei die Autoren in keinem Fall eine Färbung im Bereich der Aktin/Myosinfilamente im Zellinnern nachweisen konnten. Unabhängig von der Affinität zu spezifischen Zellstrukturen erwies sich die Intensität der Farbreaktion jedes einzelnen Lektins in verschiedenen Gewebeproben bis auf eine Ausnahme (BSA I) als bemerkenswert konstant.

Die Ergebnisse von PENA et al. (1981) bezüglich einer positiven Kernfärbung der Muskelfasern durch DBA konnten von CAPALDI et al. (1984) nicht bestätigt werden.

Vorkommen des Lektins	Abkür- zung	Spezifität
<i>Vicia villosa</i>	VVA	D-GalNAc
<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	BSA I; BSA II	α -D-Gal D-GalNAc
<i>Concanavalin ensiformis</i>	Con A	α -D-Man $\times$ α -D-Glc $\times$ α -D-GlcNAc
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	α -D-GalNAc
<i>Limulus polyphemus</i>	LPA	NANA
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA-L	D-GalNAc, NANA- β -D-Gal(1 $\rightarrow$ 3,4)- β -Glc NAc(1 $\rightarrow$ 2) $\times$ -D-Man
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	β -D-Gal($\rightarrow$ 3,4)D-GalNAc; β -D-Gal
<i>Pisum sativum</i>	PSA	α -D-Man; α -D-Glc
<i>Ricinus communis</i>	RCA I	β -D-Gal $\times$ α -D-Gal
<i>Glycine max</i>	SBA	α -D-GalNAc $\times$ β -D-GalNAc $\times$ D-Gal
<i>Solanum tuberosum</i>	STA	(D-GlcNAc) _n verbunden mit 1 $\rightarrow$ 4
<i>Ulex europaeus</i>	UEA I	α -L-Fuc
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	(β -D-GlcNAc) _n verbunden mit 1 $\rightarrow$ 4, NANA
<i>Maclura pomifera</i>	MPA	α -D-Gal

Tabelle III: Tabellarische Übersicht über gebräuchliche Lektine zur Darstellung myozellulärer Chemostrukturen (CAPALDI et al., 1985)

3. MATERIAL UND METHODE

3.1. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial diente Skelettmuskelgewebe von insgesamt 8 Schweinen, die im Rahmen der Normalschlachtung am Schlachthof München kommerziell geschlachtet und anschließend bei etwa $+4^{\circ}\text{C}$ für 24 Stunden dem gewerblich üblichen Kühlprozeß unterworfen wurden.

Nach Zerlegung der Tierkörper in Fleischteilstücke wurde jeweils aus unterschiedlichen, zufällig verteilten Abschnitten des Kotletts (= *M. longissimus dorsi*; Probe Ka), des Halses (= *M. serratus ventralis*; Probe Kb) und des Schinkens (= *M. semimembranosus*; Probe Kc) ein Kontroll-Fleischwürfel (K) entnommen. Die jeweilige Fleischprobe wurde für die späteren lichtmikroskopischen Untersuchungen auf eine Kantenlänge von ca. $1 \times 0,5 \times 0,5$ cm zugeschnitten. 10 weitere kleinere Fleischproben wurden auf eine Größe von etwa $0,1 \times 0,1 \times 0,1$ cm für die elektronenmikroskopische Präparation zerkleinert.

Der größere Teil der o.g. Fleischteilstücke (Schichtdicke von 8 bis zu 25 cm) wurde im weiteren der gesetzlich vorgeschriebenen Kälte- und Gefrierbehandlung unterzogen: Diese Probenteilstücke wurden bei -25°C eingefroren, 48 Stunden durchgefroren und dann für die Dauer von 240 Stunden bei konstanter Temperatur von ebenfalls -25°C gelagert. Danach wurden sie 48 Stunden bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Die anschließende Probengewinnung aufgetauten Gefrierfleisches erfolgte bezüglich Präparationstechnik, Entnahmestellen, Anzahl und Größe der Fleischwürfel analog zu den bei den Kontrollstücken (s. o.) angewandten Verfahren. Diese aufgetauten Gefrierfleischstücke wurden als Versuchsproben nach 240-stündiger Gefrierlagerung mit Va (für Probenstücke aus dem Kotlett), Vb (für Probenstücke aus dem Halsbereich) und Vc (für Probenstücke aus dem Schinken) benannt.

3.2. Histologische Untersuchungsmethoden

3.2.1. Probenpräparation für die Lichtmikroskopie

Für die Lichtmikroskopie wurden die unter 3.1. beschriebenen Fleischproben mit einer Kantenlänge bis zu 1 cm zunächst 24 Stunden in Bouin-Lösung fixiert und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial zur Entfernung des Alkohols und der Wasserreste 24 Stunden lang in Methylbenzoat gelagert, das während dieser Zeit dreimal gewechselt wurde. Nach Entfernung von Methylbenzoat (2 x 20 min. in Benzol) erfolgte die Einbettung der Organproben in Längsfaserrichtung in Paraplast.

Die in einer Dicke von etwa 5µm angefertigten Längsschnitte wurden routinemäßig nach Hämalaun-Eosin (H.E.), Masson-Goldner und Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbt und mit Eukitt eingedeckt.

Die Auswertung der Schnitte wurde mit Hilfe eines DIALUX 20-Fotomikroskopes (Leitz) vorgenommen und gegebenenfalls photographisch dokumentiert.

3.2.2. Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die Fleischwürfel (Kantenlänge 1mm, siehe 3.1.) wurden für 3 Stunden bei +4°C in einer 6%-igen Glutaraldehydlösung fixiert und nachfolgend in Waschlösung (0,15 M Natriumcacodylatpuffer mit Saccharosezusatz, pH 7,3; 310 mosmol) für mehrere Stunden aufbewahrt.

Nach dreistündiger Kontrastierung in 1%-iger Osmiumsäure (OsO_4), wurden die Proben in einer aufsteigenden Azetonreihe entwässert und in Araldit eingebettet. Dabei wurden die Proben in Längsfaserrichtung orientiert. Die anschließende Polymerisation erfolgte für 24 Stunden bei +35°C und für weitere 48 Stunden bei +45°C.

Mit Hilfe eines LKB Ultratoms Typ 4801 A wurden Ultradünnschnitte hergestellt, die mit einem elektronisch gesteuerten Ultrastainer (Fa. LKB) mit 2%-igem Uranylazetat und Bleicitrat nach Reynolds nachkontrastiert wurden.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Schnitte wurden mit einem Elmiskop 101 (Fa. Siemens) durchgeführt. Die Untersuchungsergebnisse wurden auf Agfa-Scientia Planfilmen bei einer einheitlichen Vergrößerung von jeweils 6000-fach photographisch dokumentiert und anschließend ausgewertet.

3.2.3. Methodik der morphometrischen Auswertung

Die morphometrische Auswertung erfolgte durch manuelle Messung der Sarkomerenlängen.

Für die morphometrischen Untersuchungen der Sarkomeren wurden die mit Eisenhämatoxylin nach Heidenhain gefärbten Schnitte herangezogen. Mittels eines Leitz-Mikroskopes wurden die Schnitte bei Ölimmersion ($\times 100$ fach) mäanderförmig durchgemustert und geeignete Schnittstellen von Längsschnitten durch Muskelfaserbündel auf einen Monitor übertragen. Dieser war mit einem Linienraster in regelmäßige Maßeinheiten unterteilt worden. Dabei entsprachen 2,7 cm / Maßeinheit im histologischen Schnitt einer tatsächlichen Länge von 10 μ m.

Pro Schnitt wurde jeweils an 20 zufällig ausgewählten Präparatestellen die Anzahl der A-Streifen über eine definierte Länge von 20 μ m gezählt. Daraus konnte der Grad der Muskelkontraktion bzw. der Muskellysis quantifiziert werden.

3.2.4. Probenpräparation für die Lektin-Fluoreszenzmikroskopie

Für dieses Nachweisverfahren wurden ca. 5 μ m dicke Paraffinschnitte von sämtlichen Organproben angefertigt, die zuvor nach den für die Lichtmikroskopie beschriebenen Verfahren vorbehandelt und eingebettet wurden. Zur Kontrolle der Lektin-Nachweise dienten Schnitte der Tunica mucosa von Rattenmägen.

Die Schnitte (mindestens zwei pro Objektträger) wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, anschließend zweimal jeweils 10 Minuten in einer Phosphatpuffer-Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 6,8 gewaschen und luftgetrocknet.

Folgende Lektine wurden für den Nachweis von Gykoproteinen in Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch verwendet:

BPA = Bauhinia purpurea	PNA = Arachis hypogaea
ConA = Concanavalin ensiformis	RCA1 = Ricinus communis 1
DBA = Dolichos biflorus	RCA2 = Ricinus communis 2
GS1 = Griffonia simplicifolia 1	SBA = Glycine max
GS2 = Griffonia simplicifolia 2	UEA1 = Ulex europaeus 1
HPA = Helix pomatia	UEA2 = Ulex europaeus 2
MPA = Maclura pomifera	WGA = Triticum vulgaris

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Inkubationsflüssigkeit wurden die 14 verschiedenen, an Fluoreszinoisothiocyanat(FITC) gebundenen Lektinlösungen (Fa. Medoc) mit einem Phosphatpuffer auf 1 : 10 verdünnt. Die Lagerung dieser Inkubationslösungen erfolgte bei -20°C. Diese wurden erst kurz vor der Verwendung bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut.

Für den Lektinnachweis wurden die Schnitte nach dem Einbringen in eine Feuchtkammer mit 100µl der verdünnten Lektin-Phosphatpuffermischung überschichtet und eine halbe Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur (+20°C) inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen der Schnitte mit PBS für jeweils 10 Minuten. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und bei -20°C im Dunkeln bis zur Beurteilung aufbewahrt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines DIALUX-Mikroskopes (Leitz) mit Fluoreszenztubus-Aufsatz bei 100-facher Vergrößerung (Ölimmersion).

Die Beurteilung des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises wurde anhand eines Bewertungsmaßstabes mit folgenden Graduationen durchgeführt:

- 0 = keine Fluoreszenz
- 1 = mittelgradige Fluoreszenz
- 2 = erhebliche Fluoreszenz

3.3. Bewertungsmaßstäbe für die Beurteilung der histologischen Veränderungen an Frischfleischproben und an aufgetauten Gefrierfleischstücken

Sämtliche histologischen Schnittpräparate wurden an Hand eines vorgegebenen Bewertungsmaßstabes beurteilt. Im einzelnen wurden nachfolgend aufgeführte Muskelgewebsstrukturen untersucht und bewertet:

F a s e r v e r l a u f :

- | | |
|-------------------------------|---|
| 0 = geringgradig geschlängelt | (bis 1/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradig geschlängelt | (bis 2/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erheblich geschlängelt | (bis 3/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

F a s e r a n o r d n u n g :

- | | |
|-------------------------------|---|
| 0 = geringgradig unregelmäßig | (bis 1/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradig unregelmäßig | (bis 2/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erheblich unregelmäßig | (bis 3/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

A b s t a n d b e n a c h b a r t e r M u s k e l f a s e r n :

- | | |
|---|---|
| 0 = keine oder nur geringgradige Vergrößerung des Abstandes | (bis 1/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradige Vergrößerung des Abstandes | (bis 2/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erhebliche Vergrößerung des Abstandes | (bis 3/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

Zerrei ssun gen:

- | | |
|----------------------------|---|
| 0 = geringgradig zerrissen | (bis 1/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradig zerrissen | (bis 2/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erheblich zerrissen | (bis 3/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

Längsauffaserung, Querauffaserung:

- | | |
|------------------------------|---|
| 0 = geringgradig aufgefasert | (bis 1/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradig aufgefasert | (bis 2/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erheblich aufgefasert | (bis 3/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

Kernveränderungen:

- | | |
|---|--|
| 0 = geringgradige Anzahl verdichteter Kerne | (bis 1/3 der Kerne zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradige Anzahl verdichteter Kerne | (bis 2/3 der Kerne zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erhebliche Anzahl verdichteter Kerne | (bis 3/3 der Kerne zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

Plasmalemm / Myolemmveränderungen:

- | | |
|--|---|
| 0 = nicht zerrissen, geringgradig abgelöst | (bis 1/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 1 = mittelgradig abgelöst, geringgradig zerrissen | (bis 2/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |
| 2 = erheblich abgelöst, mittelgradig bis stark zerrissen | (bis 3/3 der Fasern zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur) |

B i n d e g e w e b s a l t e r a t i o n e n :

- 0 = geringfügig erweitert, nicht zerrissen
(bis 1/3 des Bindegewebes zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur)
- 1 = mittelgradig erweitert, geringgradig zerrissen
(bis 2/3 des Bindegewebes zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur)
- 2 = erheblich erweitert, mittelgradig bis stark zerrissen
(bis 3/3 des Bindegewebes zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur)

F e t t z e l l v e r ä n d e r u n g e n :

- 0 = geringgradige Menge an Membranveränderungen, nicht zerrissen
(bis 1/3 der Fettzellen zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur)
- 1 = mittelgradige Menge an Membranveränderungen, geringgradig zerrissen
(bis 2/3 der Fettzellen zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur)
- 2 = erhebliche Menge an Membranveränderungen, mittelgradig bis stark zerrissen
(bis 3/3 der Fettzellen zeigt Abweichungen von der sog. Normalstruktur)

F l e i s c h s a f t m e n g e :

- 0 = geringgradige Menge an Fleischsaft ausgetreten
- 1 = mittelgradige Menge an Fleischsaft ausgetreten
- 2 = erhebliche Menge an Fleischsaft ausgetreten

Fleischsaftlokalisation:

- v = kein Austritt von Fleischsaft
- w = Fleischsaft an Zerreissungsstellen
- x = Fleischsaft am freien Rand der Organprobe
- y = Fleischsaft subplasmalemmal
- z = Fleischsaft in erweiterten Bindegewebsspalten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- FS = Fleischsaft
- M = Mitochondrium
- N = Nukleus
- Pl = Plasmalemm

Die in den elektronenmikroskopischen Abbildungen angegebenen Meßlinien entsprechen einer Länge von 1µm.

Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen eine Vergrößerung von 360-fach.

4. ERGEBNISSE

4.1. Lichtmikroskopische Ergebnisse

4.1.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen an Frischfleischproben 24 Stunden nach der Schlachtung (Kontrollgruppen) der Schweine

Die histologischen Schnittpräparate aus Kontrollproben nach 24-stündiger Lagerung der Fleischteilstücke bei $+4^{\circ}\text{C}$ sind durch nur geringgradige Abweichungen vom charakteristischen Bau des quergestreiften Skelettmuskelgewebes gekennzeichnet.

Sämtliche Organabschnitte der Kontrollproben Ka, Kb, und Kc zeigen stets gleichartige Veränderungen und stimmen in ihrer Grundstruktur überein.

Danach sind innerhalb der Kontrollgruppen Ka, Kb, und Kc der verschiedenen Körperregionen die einzelnen Muskelfasern übereinstimmend vorwiegend in ihrem Verlauf geradlinig orientiert (Abb. 4A, 5A), nur vereinzelt sind Organabschnitte vorhanden, in denen die Fasern teilweise durch einen leicht geschlängelten Verlauf gekennzeichnet sind (Abb. 6A). Die Faseranordnung sämtlicher Präparate in allen Kontrollgruppen ist vorherrschend parallel (Abb. 6A). Diese sind, soweit es die Schnittebene zuläßt, über längere Strecken kontinuierlich. Nur stellenweise wird diese Ordnung zugunsten kleiner Unregelmäßigkeiten unterbrochen: die Fasern weichen streckenweise geringfügig auseinander oder nähern sich einander; sie weisen dann einen welligen Charakter auf.

Die einzelnen Myolemmata grenzen als auffällige fibrilläre Oberflächenverdichtungen der Muskelzellen die einzelnen Muskelfaserbündel deutlich voneinander ab (Abb. 4A u. B). Gelegentlich verengen sich die Interzellularspalten fast vollständig.

In Einzelfällen erscheinen Fasern quer zu ihrer Längsrichtung ganz oder teilweise zerrissen. Diese Zusammenhangstrennungen sind in jeder Kontrollgruppe lokal nachweisbar (Abb. 4B, 8A).

Auch innerhalb der Fasern kommt es gelegentlich in deren Längsverlauf

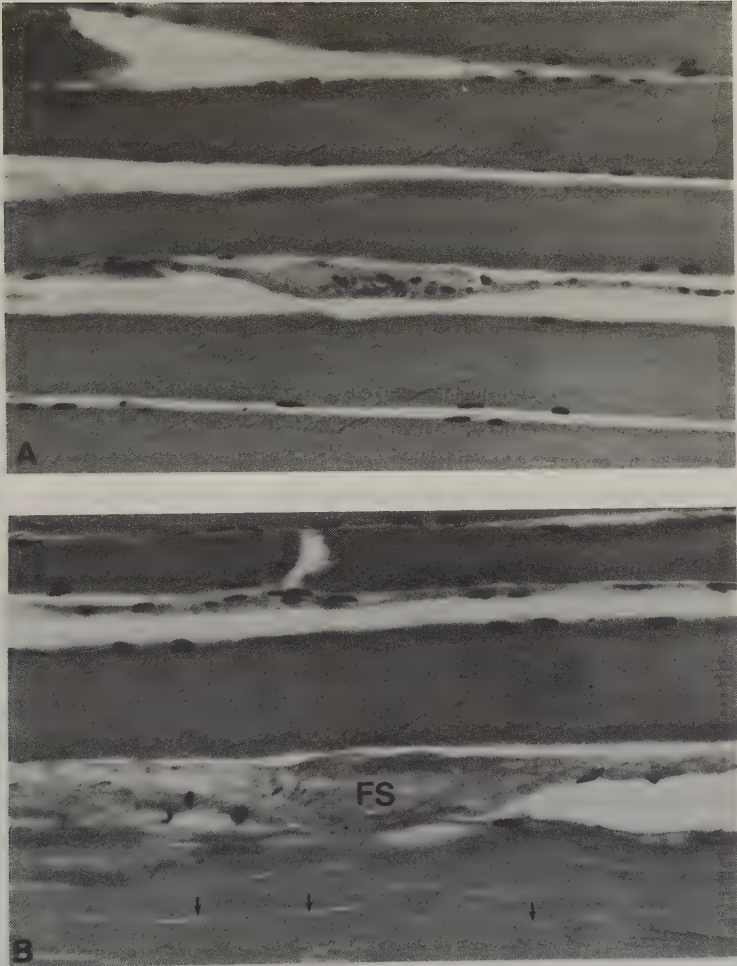


Abb. 4: Muskelgewebsveränderungen unterschiedlichen Ausmaßes 24 Stunden nach der Schlachtung.

- (A) überwiegend geradlinig orientierte Muskelfasern mit weitgehend gleichmäßigen Abständen, größtenteils anliegende Myolemmata, intaktes Bindegewebe
- (B) vereinzelte Zerreissungen quer zur Faserlängsrichtung mit Längsspaltenbildungen (↓), eng anliegende Myolemmata, freigewordener Fleischsaft in geringfügig verbreiterten Bindegewebsspalten

zum Auseinanderweichen von Myofibrillen, so daß an diesen Stellen optisch leere, stark lichtbrechende Spalträume nachgewiesen werden (Abb. 4B, 8B).

An anderen Stellen wiederum läßt die Art der Lichtbrechung eine "Aufrauung" durch Querauffaserung der Muskelfibrillen vermuten. Sowohl diese Veränderung, als auch die Spaltenbildung längs der Myofibrillen sowie die Zerreißen quer zum Faserverlauf treten in allen Kontrollgruppen häufig in vergleichbarem Maße auf (Tab. VI).

Die Zellkerne sind durchweg hell und locker strukturiert und liegen unter dem Plasmalemm dicht der Faser an (Abb. 5A).

Das Myolemm bleibt in seiner Grundstruktur als geschlossene Membran auf der Oberfläche der Muskelfasern im wesentlichen eng anliegend, obgleich es einzelne Organabschnitte gibt, bei denen diese Oberflächenmembran über kleinere Strecken von den Muskelzellen abgelöst ist. Zerreißen können nicht nachgewiesen werden (Abb. 4A, 5A, 10A).

Analoges gilt für das interstitielle Bindegewebe: sowohl Endomysium, wie auch Perimysium treten weitgehend als dichte, lamellär geschichtete Bindegewebslagen in Erscheinung, die in engem Kontakt zu benachbarten Muskelzellen stehen. Nur selten können Erweiterungen der bindegewebigen Netzsysteme auftreten (Abb. 10B). Diese sind in den Kontrollgruppen die einzigen strukturellen Veränderungen gegenüber unmittelbar postmortal fixiertem Frischfleisch (Abb. 4A).

Das univakuoläre Fettgewebe ist strukturell in seiner typischen "Siegelringform" erhalten. Nur selten verlieren die Fettzellen ihre gleichmäßig runde bis ovale Gestalt und wirken geringgradig deformiert, ohne aber Membranzerreißen aufzuweisen (Abb. 5A, 11A).

Der Austritt von Fleischsaft erscheint unauffällig bis geringfügig (Abb. 10C). Er ist vorwiegend an Muskelfaserbündeln nachweisbar, die geschädigt sind: an Zerreißenstellen des Myolemm und in den spärlich verbreiterten perivaskulären Bindegewebspalten (Abb. 4B).

Am freien Rand der Organproben sammelt sich freigewordener Fleischsaft in vernachlässigbar kleiner Menge.

4.1.2. Lichtmikroskopische Untersuchungen an aufgetauten Gefrierfleischproben von Schweinen nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsproben)

Nach der gesetzlich vorgeschriebenen Gefrierzeit von 240 Stunden bei -25°C und einer anschließenden Auftauphase von 48 Stunden bei +4°C weicht die Struktur des Skelettmuskelgewebes (Fleisches) in den einzelnen Bewertungskriterien in Grad und Umfang von den bei Kontrollproben ermittelten Werten ab. Aufgrund von Einzelbefunden oder durch Kombination von mehreren Ergebnissen kann ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen von kältevorbehandelten Proben ausgesprochen werden.

Diese Veränderungen umfassen im wesentlichen Umbauvorgänge, die die Faseranordnung, den Abstand der Muskelfasern voneinander, die Faserintegrität, die Kernstruktur, den Verlauf des Myolemm, die Bindegewebsstruktur und den Austritt von Fleischsaft aus der Muskelzelle betreffen. Wie bei den Frischfleischproben zeigen auch die aufgetauten Gefrierfleischproben stets gleichartige Veränderungen in den einzelnen Organabschnitten a, b und c.

Die Anordnung der Muskelfasern zueinander ist verändert: die regelmäßige Anordnung der Fasern ist - bis auf einige wenige Ausnahmen in jeder Versuchsgruppe - verloren gegangen. Die Interzellularräume können sich streckenweise zu unregelmäßigen, breiten Spalten erweitern oder an anderen Organabschnitten innerhalb derselben Präparate auch ganz verschwinden (Abb. 7A, 9B). Manchmal lassen sich diese Spaltbildungen bzw. Annäherungen zwischen Muskelfasern entlang der gesamten Ausdehnung einer Muskelzelle verfolgen, in anderen Fällen auch nur über kurze Distanzen (Abb. 6A³).

Diese Umbauvorgänge führen zuweilen zu einem "wellenlinienartigen" Verlauf der Muskelfasern, vielfach sogar zu bizarren Zick-Zack-Formen. Diese Veränderungen geben den Muskelpräparaten das Bild einer hohen Unregelmäßigkeit und heben die Parallelität der Faserbündel meist vollständig auf (Abb. 5B, 9A).

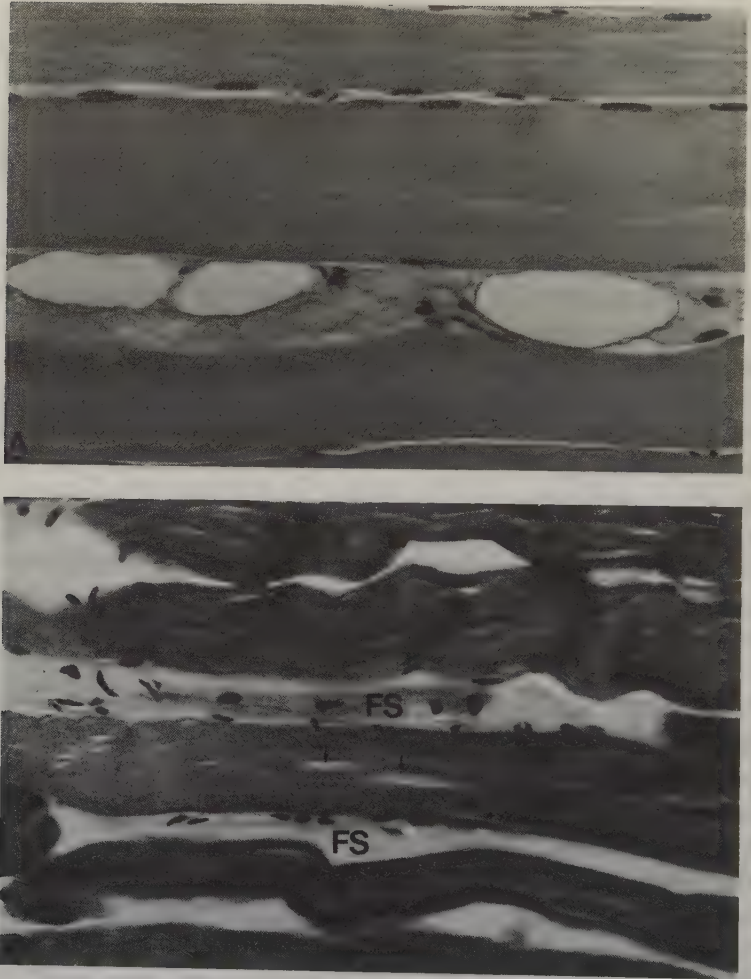


Abb. 5: Darstellung myozellulärer Strukturen in unterschiedlichem Erhaltungszustand bei Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch
 (A) parallel verlaufende Muskelfasern, Myolemm überwiegend anliegend, Zellkerne locker strukturiert, Fettzellen unverändert (24 Stunden nach der Schlachtung)
 (B) unregelmäßige Anordnung der Fasern mit z.T. extrem geschlängeltem Verlauf, Längsspaltenbildungen (↓), Zerreißen quer zur Faserrichtung mit ausgetretenem Fleischsaft, Zellkerne überwiegend pyknotisch (aufgetautes Gefrierfleisch)

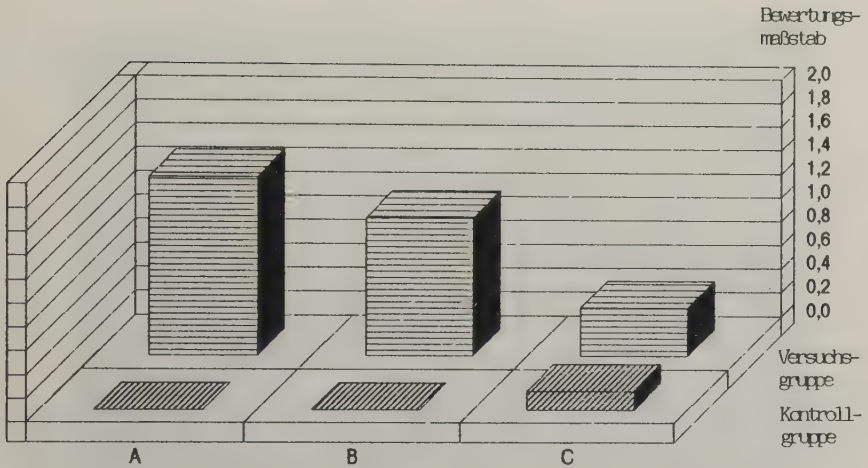


Abb. 6: Schematische Darstellung der Bewertungsmaßstäbe für den Faserverlauf (A), die Faseranordnung (B) und den Abstand benachbarter Muskelfasern (C) in Kontroll- und Versuchsgruppen (▨ bzw. ▤)

Darüberhinaus kann eine erhebliche Verringerung des Abstandes benachbarter Muskelfasern voneinander in allen Präparaten der Versuchsgruppen Va, b und c beobachtet werden (Abb. 6B). Dieses Strukturkriterium kann als eines der deutlichsten Unterscheidungsmerkmale zwischen Frisch- und aufgetautem Gefrierfleisch angesprochen werden. Die Abstandsverringerungen sind bezüglich Verteilung und Ausdehnung äußerst variabel. Des einen können sich zwei Fasern lückenlos aneinander legen und dann eine mehr oder weniger lange Strecke gemeinsam verlaufen (Abb. 7A). Des anderen rücken innerhalb ganzer Faserbündel sämtliche Fasern ohne Zwischenraum zusammen und verursachen damit an anderen Organabschnitten zusätzliche interfibrilläre Erweiterungen.

Insbesondere an den Querkanten der Schnittpräparate fällt auf, daß sich die einzelnen Fasern innerhalb der Primärbündel kongruierend an-

einanderpressen und sich teilweise sogar übereinanderschieben. In den meisten Fällen bleiben an diesen Stellen die einzelnen Fasern gerade noch als solche identifizierbar, doch können auch vollständige "Verschmelzungen" zur Bildung homogener "Faserinseln" führen.

Der Faserverlauf der einzelnen Muskelzellen weist eine, wenn auch geringe, Tendenz zu Veränderungen auf. Innerhalb der Gruppen Va, b und c treten neben unverändert geradlinig verlaufenden Fasern auch in einigen Fällen Fasern mit geschlängeltem Verlauf auf (Abb. 5B, 9A u. B).

Die Gesamtzahl an Muskelfasern mit welligem Verlauf hat zugenommen (Abb. 6 C).

Zerreissungen quer zur Längsrichtung treten bei mindestens der Hälfte der Fasern, zum Teil sogar bei einer deutlichen Mehrheit innerhalb der einzelnen Präparate auf (Abb. 8A).

Diese Zusammenhangstrennungen können in unterschiedlichstem Maße den gesamten Querschnitt oder auch nur einen Teil davon betreffen. Sie können einfach und/oder mehrfach in verschiedenen Abständen die einzelne Faser durchtrennen. Die freien Enden erscheinen dann stets unregelmäßig zerrissen. Selten treten glatte, gleichmäßige Bruchstückenden auf (Abb. 7B, 11B).

Beim Vergleich der Längsauffaserung innerhalb Kontroll- und Versuchsgruppen zeigt sich, daß beim aufgetauten Gefrierfleisch in der Mehrzahl der untersuchten Fälle die Anzahl der Leerräume zwischen den Fibrillen zunimmt (Abb. 8B). Diese Spalten entstehen dadurch, daß die einzelnen Myofibrillen in ihrem längsorientierten Verlauf auseinanderweichen und den Abstand zwischen sich unregelmäßig vergrößern. Von diesen Spaltbildungen sind nicht nur gerade verlaufende Muskelfasern betroffen, sondern genauso diejenigen mit einem mehr welligen oder sogar gezackten Charakter (Abb. 5B, 7B, 9A u. B).

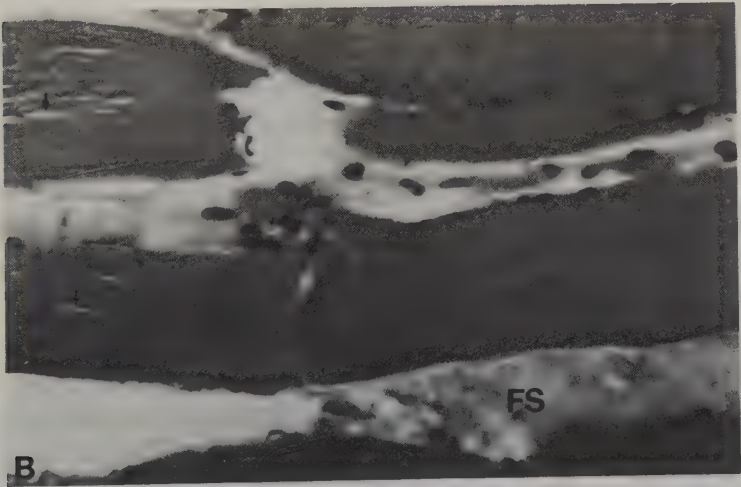
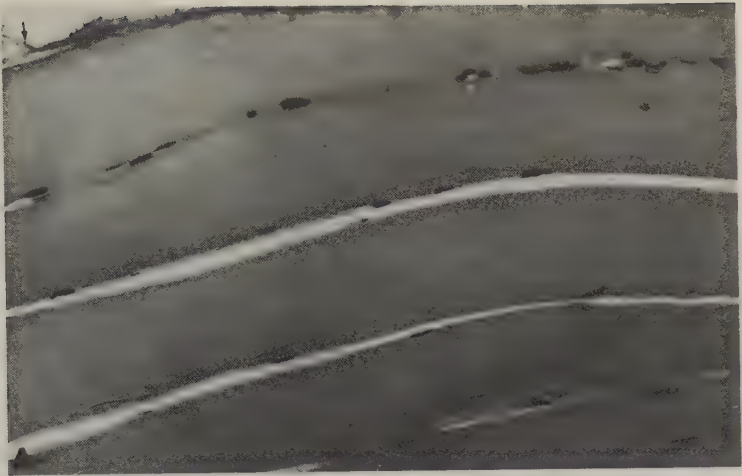


Abb. 7: Verschiedene strukturelle Veränderungen von Skelettmuskelgewebe nach 240-stündiger Gefrierlagerung und anschließendem Auftauprozess
 (A) unregelmäßige Abstände der Muskelfasern mit teilweise extremer Verringerung des Abstandes, Myolemm z.T. abgelöst (↓)
 (B) Zerreissungen quer und längs (↓) zu den Muskelfaserachsen, Interzellularräume gefüllt mit ausgetretenem Fleischsaft

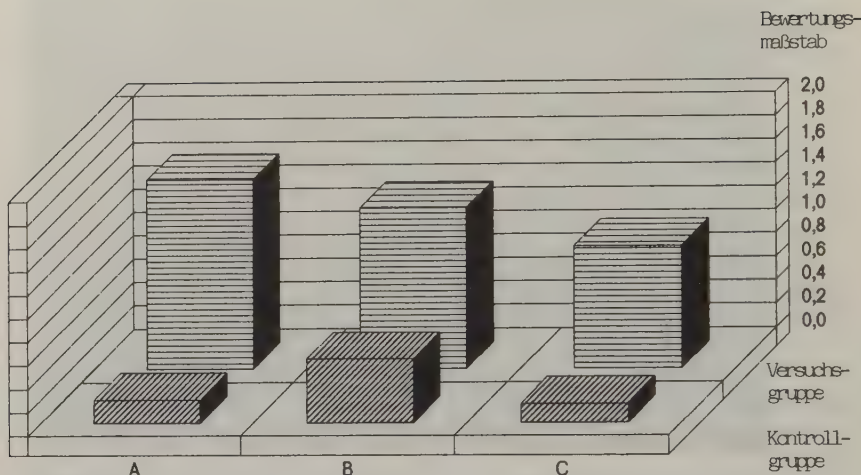


Abb. 8: Schematische Darstellung der Bewertungsmaßstäbe für die Zerreißen (A), die Längsauffaserungen (B) und die Querauffaserungen (C) in Kontroll- und Versuchsgruppen (▨ bzw. ▨▨▨)

Die Querauffaserungen an Fibrillenteilstücken in den Organproben der Versuchsgruppen, die durch ihre besondere Lichtbrechung den Schnittpräparaten an den betroffenen Stellen den Anschein geben, als sei ihre Oberfläche aufgeraut, haben deutlich gegenüber den Kontrollpräparaten zugenommen (Abb. 8C). Es gibt nur vernachlässigbar wenige Ausnahmen, die von dieser Beobachtung abweichen und sich sowohl in Kontroll- als auch Versuchsgruppe unverändert verhalten bzw. sogar vor dem Gefriervorgang eine größere Anzahl an Querauffaserungen aufwiesen als danach.

Bei den Versuchsproben treten vornehmlich Kerne mit verdichtetem Chromatin auf. Das Ausmaß dieser Chromatinkondensation ist stark variabel: Zellkerne können in allen Übergangsstadien in einem verdichteten, über

ein pyknotisches bis zum karyorhektischen Zustandsbild beobachtet werden (Abb. 5B, 11B).

Eine deutliche Alteration erfährt das Myolemm in seinem Verlauf als Gitterfasermantel um die einzelne Muskelfaser. Abgesehen von jeweils nur einer Ausnahme innerhalb der Versuchsgruppen, die sich gegenüber den Kontrollgruppen als unverändert erweist, ist eine Ablösung des Myolemm von der Oberfläche der Muskelzelle nachweisbar (Abb. 10A). Das Myolemm löst sich entweder völlig von der Muskelfaser oder ist nur streckenweise von der zugehörigen Muskelzelle abgelöst. Die Ausdehnung der Ablösung ist lichtoptisch nachweisbar, ihre Länge variiert stark (Abb. 7A, 9A).

Tritt eine vollständige Zusammenhangstrennung zwischen Myolemm und Muskelzelle auf, dann ist dieser Vorgang meist mit Rupturen der fibrillären Schicht verbunden.

Ähnlich ausgeprägten Veränderungen ist das interstitielle Bindegewebe unterworfen. Sowohl die Netzstruktur des Endo- als auch die des Perimysiums erweitert sich mit ausgeprägter Auflösung der Faseranordnung. Die fibrillären Bereiche des Epi- und Perimysiums erscheinen ebenfalls vergrößert. Insbesondere an den Stellen, an denen sich die präformierten Interzellularspalten übermäßig durch den Gefrier- und Auftauprozess verbreitert haben, kommt es durchwegs zu Auffaserungen oder häufig zu Zerreissungen der Bindegewebsfasern.

Muskelfaserzerreissungen gehen in der Regel mit Bindegewebszerreissungen einher. Man kann sogar durch die außerordentlich enge Verknüpfung der kontraktiven Muskelzellen mit den Kollagenfasern des Bindegewebes von einer direkten Proportionalität zwischen der Zunahme der Muskelfaserzerreissungen und den Zerreissungen von Kollagenfasern sprechen. Diese Veränderungen treten ausnahmslos bei allen Versuchsgruppen in mehr oder weniger auffälliger Weise auf (Abb. 10B).

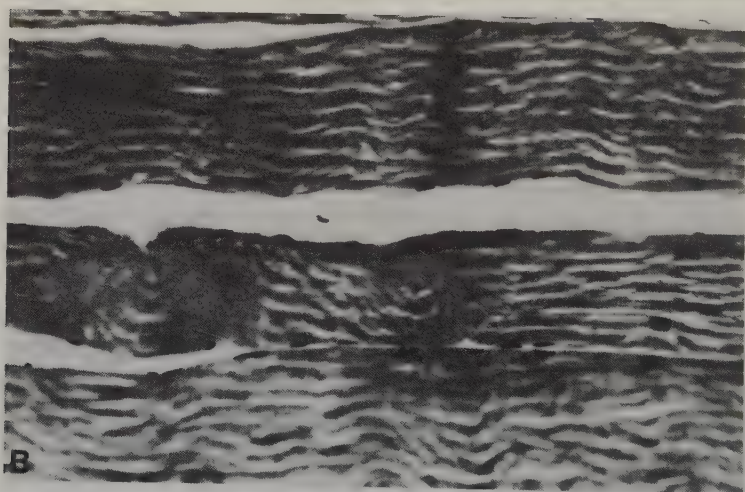
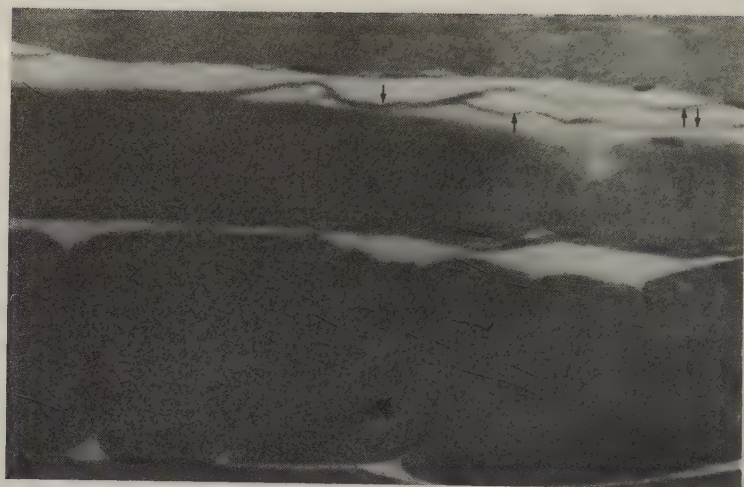


Abb. 9: Unterschiedliche morphologische Veränderungen von aufgetautem Gefrierfleisch

- (A) vereinzelte Längsspaltenbildungen (▼), partielle Muskelfaserrupturen, extreme Wellenlinienbildung, Myolemm über weite Strecken abgelöst (↓)
- (B) extreme Längsauffaserung der Muskelzellen, unregelmäßige Abstände der Muskelfasern voneinander, z.T. geschlängelter Verlauf der Fasern.

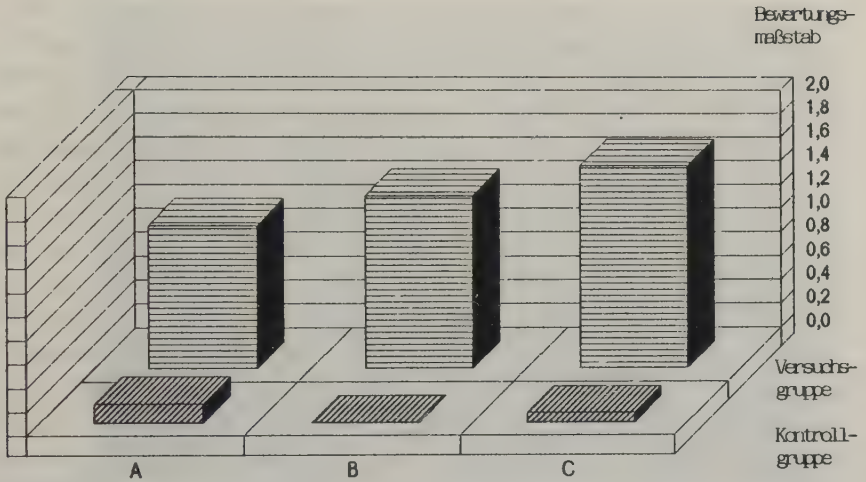


Abb. 10: Schematische Darstellung der Bewertungsmaßstäbe für die Plasmalemm/Myolemmveränderungen (A), für die interstitiellen Bindegewebsalterationen (B) und die Fleischsaftmenge (C) in Kontroll- und Versuchsgruppen (▨ bzw. ▤)

Der prozentuale Anteil an freigewordenem Fleischsaft ist innerhalb und zwischen den einzelnen Faserfragmenten, in präformierten interstitiellen Faserbereichen und innerhalb der durch die Gefrierschäden entstandenen Räume gegenüber den Frischfleischproben erheblich vermehrt (Abb. 10C). Insbesondere in den nach Masson-Goldner gefärbten Schnitten ist der Fleischsaft farblich als hellrosa, homogen erscheinende "Masse" darstellbar. Dieser extrazellulär auftretende Fleischsaft setzt sich farblich damit deutlich vom interstitiellen Bindegewebe (grün) und von der intakten Muskelfaser (rot) ab (Tab. VI).

Freier extrazellulärer Fleischsaft tritt in allen Organproben der Versuchsproben auf. Bevorzugt nachweisbar ist er in den durch die Kältebehandlung verbreiterten Interzellularspalten und zwar vor allem dort, wo durch die Schädigung des Endo- und Perimysiums vermehrt Freiraum

geschaffen wurde für die Aufnahme des ausgetretenen Zellwassers (Abb. 11B). Auch an allen Zerreißungsstellen quer zur Längsrichtung der Skelettmuskelfasern befindet sich freier Fleischsaft. Er füllt beinahe regelmäßig die Lücken zwischen den Bruchstücken und dehnt sich in das interstitielle Nachbargewebe aus (Abb. 5B, 7B). Seltener sammelt sich Fleischsaft an den freien Schnittträgern der Präparate. Er befindet sich dort in erster Linie an deren Breitseiten und scheint durch das enge Zusammenrücken der Muskelzellen an einigen Stellen förmlich aus ihnen ausgepreßt zu sein.

In einigen Fällen ist Fleischsaft - auch färberisch nachweisbar - zwischen abgelösten Abschnitten des Myolemm und den Muskelfasern gelegen. Dieses Verhalten gilt auch wieder nur für Organproben der Versuchsgruppen.

Bei der Beurteilung des univakuolären Fettgewebes muß man unterscheiden zwischen Fettzellpaketen, die von größeren Bindegewebsspolstern umgeben sind und Fettzellen, die vereinzelt oder in kleineren Gruppen zwischen die Muskelfasern oder Primärbündel eingestreut liegen. Immer scheinen die Veränderungen vom Ausmaß der Zerstörung im Nachbargewebe abhängig zu sein: während die ersteren, größeren Zellager oft nur leichte Deformationen in ihrer "Siegelringstruktur" aufweisen, wirken die letzteren, kleineren Fettzellgruppen und die einzelnen Vakuolen wesentlich häufiger stark komprimiert. Ihre Zellgrenzen sind geborsten und vielfach zerrissen (Abb. 11B).



Abb. 11: Skelettmuskelgewebsveränderungen vor und nach Gefrierbehandlung

- (A) intakte, regelmäßig angeordnete Muskelfasern, z.T. mit kleinen Rupturen ($\downarrow$), Fettzellen minimal deformiert (Frischfleisch)
- (B) freigewordener Fleischsaft an Zerreißungsstellen und in breiteren Interzellularspalten, Fettzellen deformiert mit z.T. gebohrstenen Membranen (aufgetautes Gefrierfleisch)

4.2. Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse

Von den 14 getesteten, an FITC-gebundenen Lektinen können 7 Lektine (GS1, GS2, HPA, MPA, PNA, SBA und UEA2) weder an 24 Stunden gelagertem Frischfleisch, noch an aufgetautem Gefrierfleisch eine Fluoreszenzfärbung morphologischer Strukturen hervorrufen.

Die positiven Lektin-inkubierten Organproben (BPA, ConA, DBA, RCA1, RCA2, UEA1 und WGA) zeigen ein sehr uneinheitliches Färbungsmuster. Extrazelluläre Skelettmuskelbestandteile wie Myolemm, Bindegewebsfasern, Gefäße, Nerven und Fettzellen sind die einzigen Strukturen mit mehr oder weniger intensivem Färbeverhalten.

Zelluläre Bauelemente bleiben stets ungefärbt.

Bei den Lektinen ConA, DBA, RCA1, RCA2 und UEA1 ist der vorherrschende Eindruck der Untersuchungen die erhebliche Diskontinuität und Variabilität der Farbreaktionen in den einzelnen Organproben bei allen untersuchten Tieren. Diese große Variationsbreite des Färbeverhaltens erstreckt sich gleichermaßen auf 24 Stunden gelagertes Frischfleisch und aufgetautes Gefrierfleisch.

Es lassen sich zwar bei einigen Lektinen bevorzugte Interaktionen mit bestimmten Strukturen vermuten (z.B. DBA: Spezifität für Bindegewebsfasern und Fett; RCA2: Spezifität für Myolemm, Gefäße und Fett), das Färbungsmuster ist jedoch bei den jeweils bevorzugten Strukturelementen von Tier zu Tier zu unterschiedlich, um endgültige Aussagen über die Affinität zu spezifischen Strukturen machen zu können.

Die größte und äußerst gleichmäßige Farbtintensität zeigt das Wheat-germ Agglutinin (WGA). Es färbt Myolemm, Bindegewebsfasern, Gefäße und Fettzellen sowohl nach 24-stündiger Lagerung als auch nach Gefrieren und Auftauen gleichmäßig und regelmäßig stark.

Für die Unterscheidung zwischen Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch ist es dadurch jedoch unbrauchbar.

Geeigneter erscheint hierfür das Lektin BPA. Es färbt bevorzugt Bindegewebsfasern, Fett und Gefäße von 24 Stunden gelagertem Frischfleisch.

Tier-Nr.:	Myolemm					Bindegewebsfasern					Gefäße					Nerven					Fett				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
BPA: Frischfleisch Gefrierfleisch	0	0	1	0	1	1	1	2	1	2	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	2	1	2	1	2
ConA: Frischfleisch Gefrierfleisch	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	0	1	1	2	2	0	0	0	0	1	1	2	2	2	2
DBA: Frischfleisch Gefrierfleisch	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1
RCA1: Frischfleisch Gefrierfleisch	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RCA2: Frischfleisch Gefrierfleisch	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
UEA1: Frischfleisch Gefrierfleisch	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
WGA: Frischfleisch Gefrierfleisch	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	0	0	2	2	2	2	2

Tabelle IV: Tabellarische Gegenüberstellung des Bewertungsmaßstabes (Farbintensität) einzelner Skelettmuskelbestandteile von Frischfleisch nach 24-stündiger Lagerung und 240 Stunden gefrorenem und aufgetautem Fleisch, nach Inkubation mit 7 verschiedenen Lektinen

Zwar ist die Farbintensität und auch das Verteilungsmuster des Fluoreszenzfarbstoffes nicht konstant, doch es läßt sich insgesamt bei allen 5 untersuchten, frisch geschlachteten Schweinen eine positive Farb-reaktion nachweisen.

Bei den gefrorenen und aufgetauten Gefrierfleischproben verliert das BPA dagegen seine Affinität zu diesen Strukturen, wodurch sich diese völlig ungefärbt darstellen.

Es liegt somit die Vermutung nahe, daß dieses an FITC gebundene Lektin als Tracer-Substanz zur Identifizierung von 240 Stunden gefrorenem und aufgetautem Fleisch geeignet sein könnte.

4.3. Morphometrische Untersuchungen an Frischfleischproben (K) und an aufgetauten Gefrierfleischproben (V) beim Schwein

Innerhalb der einzelnen Kontrollgruppen (K) wie auch innerhalb jeder einzelnen Probe variiert die Anzahl der A-Banden pro Meßeinheit erheblich. Allen Frischfleischproben ist 24 Stunden nach der Schlachtung gemein, daß in ihnen sowohl Muskelfasern auftreten, die sich in einem ausgeprägten Zustand der postmortalen Kältestarre befinden, als auch solche, die eine ausgedehnte Lysis aufweisen. Innerhalb einer Probe können diese extremen Zustandsformen auch unmittelbar nebeneinander liegen. Auch Zwischenformen von beginnendem Rigor über das Vollbild des Rigor mortis, beginnender Lysis bis zur völligen Lysis sind anzutreffen. Auch bezüglich Lokalisation und Quantität der unterschiedlichen Kontraktionsstadien der Myofilamente läßt sich keine Regelmäßigkeit erkennen (Tab. X A, B, C).

In gleicher Weise uneinheitlich erscheinen auch die aufgetauten Muskelproben nach 240 Stunden Gefrieren. Es treten - wiederum völlig nach dem Zufallsprinzip verteilt - Muskelfaserbündel mit engen Banden auf, die dem Bild des vollständigen Rigor entsprechen und solche Fasern, die im Stadium einer fortgeschrittenen oder ausgeprägten Lysis vorliegen. Letztere weisen extrem auseinanderweichende Banden auf.

In 3 von 8 untersuchten Tieren überwiegt in den Versuchsgruppen die Anzahl der Muskelfasern, die sich im Stadium einer mittelgradigen bis stark entwickelten Lysis des postmortalen Kälterigors befinden. Bei weiteren 3 Tieren liegen gegenteilige Strukturbilder der Sarkomeren vor. In diesen Fällen ist eine quantitative Zunahme des lichtoptisch erkennbaren Rigor mortis in den Muskelzellen zu erkennen. Bei 2 Tieren treten gegenüber den Kontrollgruppen keine erkennbaren Veränderungen auf.

Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, daß der Gefriervorgang keinerlei Einfluß auf den Rigor-Lysiszustand der Muskelfasern hat. Sowohl der zunehmende Verlust an Dehnbarkeit als auch die Lösung der Aktin-Myosin-Komplexe scheint sich immer in dem Zustand zu stabilisieren, der sich bereits vor dem Einfrieren eingestellt hatte.

4.4. Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse

4.4.1. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Frischfleischproben 24 Stunden nach der Schlachtung (Kontrollproben) der Schweine

Durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen können die lichtmikroskopischen Ergebnisse grundsätzlich bestätigt werden. Sie geben darüberhinaus Aufschluß über morphologische Details, die lichtoptisch nicht erfaßbar sind.

Z e l l k e r n e

Die subplasmalemmal gelegenen Zellkerne treten in einer großen Formenvielfalt auf. Die doppelte Kernmembran ist in der Mehrzahl der Fälle weitgehend geschlossen. Das Karyoplasma ist gekennzeichnet durch das Auftreten von ein bis zwei dichten Nucleoli und durch einen geringen Ausbildungsgrad des randständigen Heterochromatins (Abb. 14A). Nur vereinzelt sind Kerne vorhanden, in denen das elektronenoptisch dichte Heterochromatin sich zu größeren homogenen Konglomeraten verbindet. Das Euchromatin liegt in lockerer Form als gleichmäßig flockiges Material über die gesamte Kernmatrix verteilt. In manchen Kernen ist diese Flockenbildung sehr stark ausgeprägt und wechselt mit elektronenoptisch leeren Flächen. (Abb. 12 A u. B, 13A).

T- und L-System (Sarkoplasmatisches Retikulum)

Die zwei Komponenten des sarkoplasmatischen "Kanälchensystems" sind den Myofibrillen in charakteristischer Weise räumlich zugeordnet. Elektronenmikroskopisch erscheinen die kontrastreichen Anschnitte des L-Systems als kleine, unregelmäßig geformte Hohlräume und die in das Innere der Zelle ziehenden Plasmalemm-Ausstülpungen (T-System) als schlauchförmige, kontrastärmere Membranen.

In den interfibrillären Spalträumen dehnen sich die Vesikel des L-Systems über die gesamte Reichweite eines Sarkomers aus, während sich die T-Tubuli bevorzugt am Übergang von A- zu I-Banden nachweisen lassen.

Bei idealer Schnittführung sind an diesen Stellen die Triaden erkennbar.

M i t o c h o n d r i e n

Die Mitochondrien vom Crista-Typ liegen meist perlschnurartig aneinandergereiht in den interfibrillären Spalträumen und in den subplasmalemalen Randbezirken. An manchen Sarkoplasmaabschnitten treten sie ungeordnet und dichtgedrängt auf. Ihre Form ist von dem ihnen zur Verfügung stehenden zytoplasmatischen Raum, der Schnittführung und von postmortalen Abbauvorgängen abhängig. Sie reicht von schmalen, ellipsenförmigen über ovoide bis hin zu kreisrunden Gebilden. Diese Organellen zeigen zumeist ein leicht gequollenes Erscheinungsbild.

Die Außenmembranen aller Mitochondrien erscheinen als dünne, gut abgrenzbare und in der Regel intakte strukturelle Einrichtungen. Die Cristae mitochondriales sind deutlich kontrastiert. Sie unterteilen regelmäßig die Organellenmatrix und lassen in den meisten Fällen eine geordnete Struktur erkennen. Nur an Stellen, an denen massive Organisationsverluste der Muskelfasern nachweisbar sind, kommt es im Zuge dieser Schädigung auch zur Zunahme von Matrixveränderungen: Die Cristae erscheinen elektronenoptisch dichter; sie weisen unterschiedlich starke Zerreissungen auf. Der sie umgebende Raum kann eine ungleichmäßig verteilte, diffuse Substanz einschließen. Selten tritt ein vollständiger Verlust der Innenstruktur auf; diese Mitochondrienreste erscheinen dann elektronenmikroskopisch als "leere Vakuolen" (Abb. 12 A u. B, 14A).

G l y k o g e n

Glykogen ist in granulärer Form in den interfibrillären Spalträumen sowie in der Nachbarschaft von Mitochondrien und Triaden lokalisiert. Die feinen, elektronenoptisch dichten Granula sind in der Regel zu kleineren, dichten Gruppen zusammengelagert, bleiben aber auch einzeln nachweisbar.

I n t e r f i b r i l l ä r e S p a l t r ä u m e

Die interfibrillären Spalträume innerhalb der einzelnen Muskelzellen weisen größtenteils gleichmäßig und regelmäßig enge Abstände zwischen

den einzelnen Myofibrillen auf (Abb. 12 A). Die Verbindung benachbarter Sarkomere über die Z-Scheiben bleibt erhalten. Nur an auffallend verbreiterten interfibrillären Räumen tritt ein Kontaktverlust von nebeneinanderliegenden Z-Scheiben auf, wobei in der Mehrzahl dieser Fälle eine zumindest partielle Verbindung durch überbrückende Filamente erhalten bleibt.

Die Spalträume sind in unterschiedlicher Anzahl und Verteilung ausgefüllt mit Membransystemen des T- und L- Systems, mit Mitochondrien, feinen Glykogengranula und osmiophilen Einschlüssen (Abb. 12 B).

Verlauf der Myofibrillen und -filamente
Unabhängig vom Rigor-Lysiszustand kommt es durch das Auseinanderweichen der Myofilamente in ihrem longitudinalen Verlauf an einigen wenigen Stellen zur Bildung von kleineren, manchmal auch stärker erweiterten intrafibrillären Spalträumen (Abb. 12 A). Insgesamt überwiegt jedoch der Eindruck von parallel verlaufenden Myofilamenten, welche in regelmäßiger Ordnung miteinander verknüpft sind.

Zerreissungen quer zu den Fibrillenachsen sind nur ausnahmsweise zu beobachten. An diesen Stellen kann Fleischsaft als elektronenoptisch helles, feingranuläres Material mit elektronenoptisch dichteren, unregelmäßig geflockten Einlagerungen nachgewiesen werden.

Feinbau der Sarkomeren und Verlauf der Querstreifung

Sämtlichen Muskelproben ist eine große Variationsbreite bezüglich der Sarkomerenlänge gemein. Es kommen sowohl stark kontrahierte als auch übermäßig verlängerte Sarkomeren vor (Abb. 12 A u. B).

Der strukturelle Aufbau der im Rigor mortis befindlichen Sarkomere und deren filamentäre Untereinheiten läßt bei allen kontrahierten Sarkomeren einen Gliederungsverlust erkennen. Die Z-Scheiben erscheinen als dicke, teilweise etwas unscharf begrenzte, kontrastreiche Streifen. Sie liegen inmitten der nur sehr schwach ausgebildeten I-Bande, welche je nach Intensität des Rigorzustandes kontinuierlich an Ausdehnung verliert, bis sie sogar in manchen Rigorabschnitten elektronenoptisch völlig verschwindet.

Innerhalb der A-Banden sind die M- und H-Streifen nur andeutungsweise nachweisbar.

Durch die Verkürzung der Sarkomere bekommen diese ein sanduhrförmiges Aussehen. Die meist unverzerrten Z-Scheiben benachbarter Myofibrillen verlieren nur in breiten interfibrillären Spalträumen den Kontakt zueinander, liegen aber größtenteils auf gleicher Höhe (Abb. 12 B).

Mit beginnender Lysis der Sarkomere zeigt sich eine zunehmende Tendenz zur Ausbildung der typischen Bandengliederung, die aber von besonderen strukturellen Eigentümlichkeiten begleitet wird: Die nach wie vor unscharf konturierten Z-Scheiben verlieren an Breite. Sie können bei übermäßiger Dehnung der Aktinfilamente intrafibrilläre Verzerren und Zerreissungen aufweisen. Diese Zusammenhangstrennungen können auch zwischen benachbarten Z-Scheiben auftreten und damit eine stufenartige Versetzung der Fibrillen in ihrem Längsverlauf bewirken. Die I-Bande erfährt mit zunehmender Lösung des Kälterigors eine deutliche Verbreiterung. An manchen Stellen wird sie beidseits der Z-Scheibe zusätzlich von dicken, inhomogenen Filamenten durchzogen. Durch das unterschiedliche Brechungsvermögen der nebeneinanderliegenden I- und A-Banden kommt es zu einer deutlichen Abgrenzung der A-Banden. Die M- und H-Streifen sind gut sichtbar, können aber insbesondere in den Schnittpräparaten, in denen noch keine ausgeprägte Lysis eingetreten ist, beidseits von geringfügig verdichteten Zonen flankiert sein. Diese lassen sich auf überlappende Aktinfilamente zurückführen (Abb. 12 A).

Mit der fortschreitenden Lysis vollzieht sich gleichzeitig ein Formenwechsel: Die Sarkomere verlieren ihre konkave Gestalt und nehmen Spindelform an (Abb. 12 A).

Plasmalemm

Das Plasmalemm stellt sich elektronenoptisch als geschlossene äußere Oberflächenmembran dar.

Außen sind dem Plasmalemm als Myolemm Basallamina und Kollagenfasern vom Typ III aufgelagert. Beide Schichten liegen der Zelloberfläche relativ dicht an. Sie zeigen nur an wenigen Stellen Ablösungen von

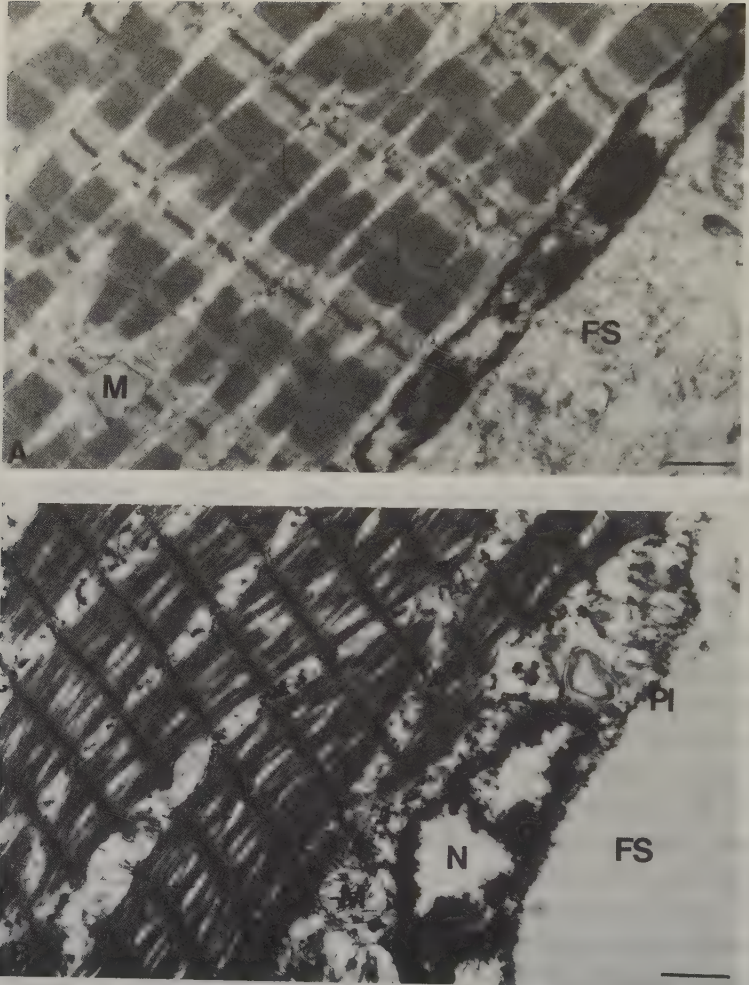


Abb. 12: Verschiedene Kontraktionszustände und Zerstörungsgrade myozellulärer Strukturen 24 Stunden nach der Schlachtung

- (A) in Lysis befindliche, spindelförmige Sarkomere, zusätzliche, schmale, dichte Streifen in den A-Banden ($\downarrow$), verdichteter Zellkern mit Heterochromatinaggregaten, Plasmalemm abgehoben, subplasmalemale Flüssigkeitsansammlung, Mitochondrien z.T. mit scharf gezeichneten Cristae
- (B) sanduhrförmig kontrahierte Sarkomere mit ausgeprägter Längsspaltenbildung in zentralen Sarkomerenabschnitten ($\downarrow$), filamentäre Brückenbildung benachbarter Z-Scheiben (∇), Mitochondrien in unterschiedlichem Erhaltungszustand, freier interzellulärer Fleischsaft

der Zellmatrix, wobei der subplasmalemmale Spaltraum regelmäßig feinflockiges Material enthält, welches mit osmiophilen Substanzen durchsetzt ist. Innerhalb aller Kontrollproben behält jedoch das Plasmalemm seine geschlossene Integrität bei (Abb. 12 B).

I n t e r z e l l u l a r r a u m

Die Interzellularräume erscheinen gleichmäßig eng. In ihnen sind elektronenoptisch dichte Einschlüsse, einzeln oder gebündelt auftretende Kollagenfasern vom Typ I und kleine, intakt aussehende Arteriolen und Venolen nachweisbar.

In Schädigungsbezirken des Muskelgewebes treten zusätzlich freie Zellorganellen in den Interzellularspalten auf (Abb. 14 A).

4.4.2. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an aufgetauten Gefrierfleischproben von Schweinen nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsproben)

Die Proben zeigen im elektronenmikroskopischen Auflösungsbereich erhebliche Alterationen gegenüber nicht gefrorenem Frischfleisch. Sie dokumentieren sich vor allem im quantitativen Anstieg und dem zunehmenden Grad an Zerstörungen einzelner Zellbestandteile.

Z e l l k e r n e

Neben nahezu intakten Zellkernen sind gehäuft Kerne nachweisbar, die einen stark verbreiterten, fragmentierten und unregelmäßig konturierten Heterochromatinsaum aufweisen.

Das Karyoplasma besteht vielfach aus einem flockig verdichteten Euchromatin mit eingelagerten Heterochromatinaggregaten. Die Kernmembran folgt zunehmend faltigen Einkerbungen der Kernmatrix, sofern sie überhaupt noch nachweisbar ist (Abb. 13 B, 14 B).

In Nähe der randständigen, pyknotisch veränderten Zellkerne ist fast immer das Plasmalemm abgehoben, oft auch zusätzlich frakturiert (Abb. 14 B). Meist geht der unmittelbare Kontakt der Kerne zu den benachbarten Myofibrillen ebenfalls verloren (Abb. 13 B).

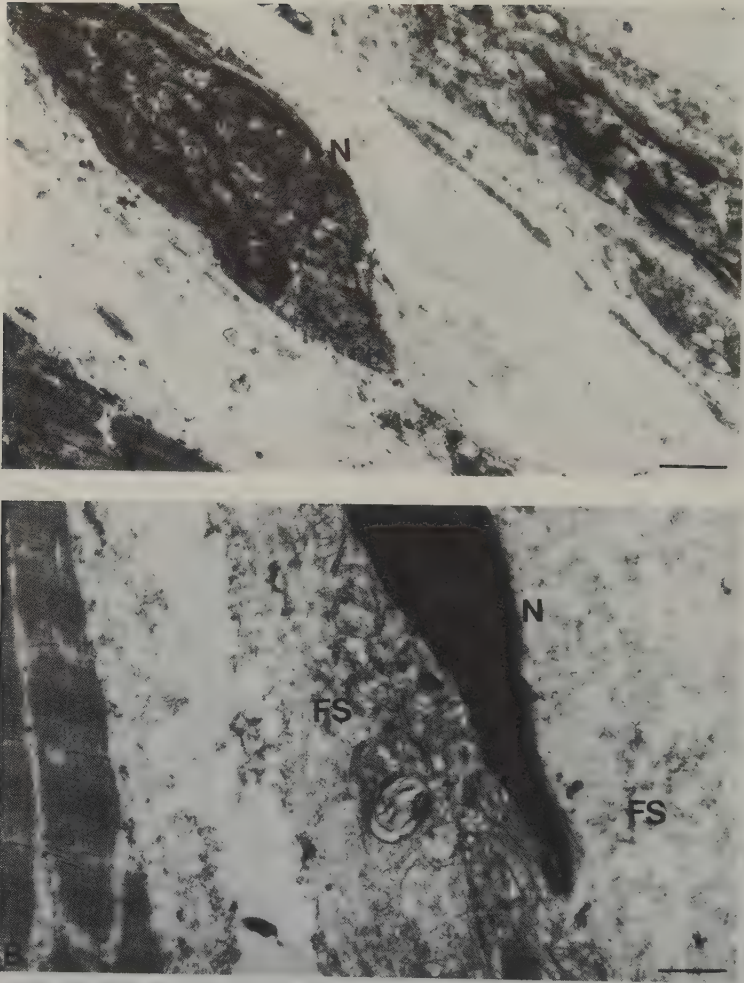


Abb. 13: Unterschiedlich stark veränderte Zellkerne von Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch

- (A) 2 Kerne benachbarter Muskelzellen 24 Stunden nach der Schlachtung mit flockigem Karyoplasma, geringem Heterochromatingehalt, Kontakt zu Myofibrillen aufgehoben, Plasmalemm teilweise abgelöst
- (B) stark verdichteter, heterochromatinreicher Zellkern, weit von den Myofibrillen entfernt, umgeben von feinflockiger Zellflüssigkeit, Plasmalemm weit abgehoben (aufgetautes Gefrierfleisch)

T- und L-System (Sarkoplasmatisches Retikulum)

Das Tubulussystem des sarkoplasmatischen Retikulums zeigt durch die Versuchsanordnung keine auffallenden Veränderungen. Die Membranen des T- und L-Systems sind nach wie vor vereinzelt nachweisbar. Die Hohlräume der T-Schläuche behalten ihre, je nach Schnittführung schmale bis rundliche Gestalt genauso bei wie die meist längsoval angeschnittenen, kontrastreichen Lateralsäckchen des L-Systems.

Mitochondrien

Die Mitochondrien zeigen in ihrer Struktur gegenüber den Kontrollproben deutliche Abweichungen. Die normalerweise gleichmäßig verlaufende, elektronenoptisch dichte Membran erscheint in höchstem Maße oftmals frakturiert. Ist diese Außenmembran zerstört, so ist immer auch die Sarkosomenmatrix verändert, wohingegen eine Matrixveränderung nicht unbedingt eine Alteration der Außenmembran beinhaltet. Oft ist eine unbeschädigte Außenmembran das einzig intakte Strukturelement der Mitochondrien. Die Cristae mitochondriales sind insgesamt sehr viel unschärfer gezeichnet als im ungefrorenen Zustand. Ein aufgelockertes, inhomogenes, ungeordnetes Erscheinungsbild der Innenleisten ist die Regel. Bei etlichen Sarkosomen ist die Innenstruktur noch weitergehenden Degenerationsvorgängen unterworfen, wobei entweder die gesamte Matrix aus feinflockigem Material mit einzelnen osmiophilen, vesikulären Einlagerungen besteht oder nur noch elektronenoptisch leere Vakuolen auftreten (Abb. 15 A u. B, 16 A u. B).

Glykogen

Sowohl aggregierte als auch einzelne Glykogenpartikel sind nur sehr spärlich in bekannter, feingranulärer Form in interfibrillären Spalträumen und in subplasmalemal entstandenen Zwischenräumen anzutreffen.

Interfibrilläre Spalträume

Die interfibrillären Spalträume zeigen einen sehr variablen Verlauf: Es treten wie bei den Frischfleischproben Ausbuchtungen durch die konkaven Stellen auf, welche bei kontrahierten Sarkomeren in der Mitte der

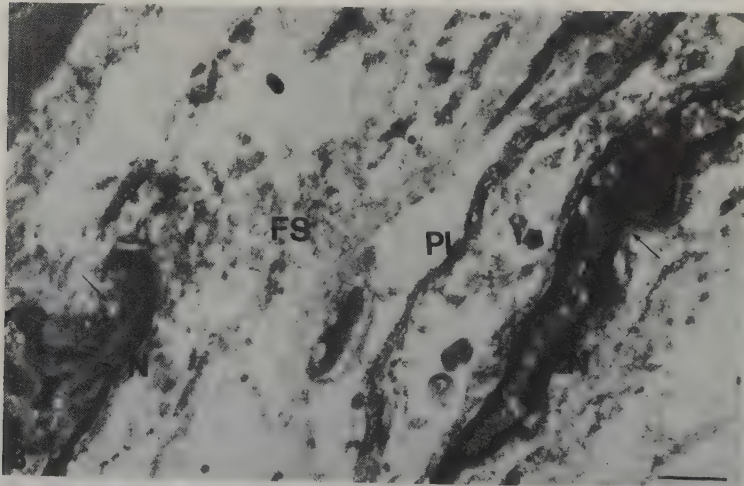
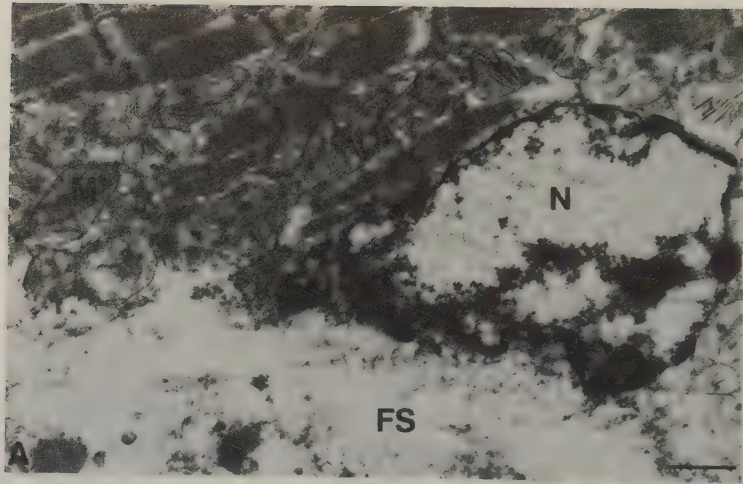


Abb. 14: Zellzerstörungen unterschiedlichen Ausmaßes bei Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch

- (A) Ansammlung z.T. deutlich strukturierter Mitochondrien an Zerrei-
 sungsstellen der Myofibrillen und in interfibrillären Spalträumen,
 Zellkern mit wenig Heterochromatin, Plasmalemm abgehoben (24 Std.
 nach der Schlachtung)
- (B) pyknotische Zellkerne mit fragmentiertem Heterochromatin und rup-
 turierten Membranen (↓), Plasmalemm abgelöst mit Zerrei-
 sungen, freier subplasmalemaler und interzellulärer Fleischsaft (aufge-
 tautes Gefrierfleisch)

A-Banden, bei gelösten Sarkomeren an den I-Banden liegen. Häufiger als bei den Kontrollgruppen findet man daneben sowohl Fibrillen, die fast lückenlos über weite Strecken parallel nebeneinander verlaufen, als auch solche, die übermäßig weit auseinanderweichen und dabei unregelmäßig breite und lange Spalträume zwischen sich ausbilden. Besonders die extrem verbreiterten interfibrillären Räume sind angefüllt mit feinflockigem Material und Zellorganellen in unterschiedlichem Erhaltungszustand (Abb. 16 A u. B).

Ein vollständiger Kontakt bzw. eine totale oder partielle filamentäre Brückenbildung zwischen benachbarten Z-Scheiben ist nur noch an den engen, parallel verlaufenden Spalträumen nachweisbar. Zumeist liegen Z-Scheiben ohne Verbindung versetzt zueinander frei (Abb. 16 A u. B).

V e r l a u f d e r M y o f i b r i l l e n u n d - f i l a m e n t e

Die überwiegend parallele Anordnung der Myofibrillen auch bei aufgetauten Gefrierproben ist erhalten. Sehr viel häufiger als bei den Kontrollproben kommt es bei den Proben dieser Versuchsgruppen jedoch zum Auseinanderweichen von filamentären Funktionseinheiten mit intrafibrillärer Spaltbildung bzw. Zerreissungen der Myofilamente (Abb. 15 B). Die Zusammenhangstrennungen können nur einzelne Filamente betreffen oder sich über die gesamte Ausdehnung eines Sarkomers erstrecken. Die entstandenen Lücken sind nur selten völlig leer. Sie enthalten zumeist eine inhomogene Substanz mit feingranulären Flocken und eingelagerten Zellfragmenten.

F e i n b a u d e r S a r k o m e r e n u n d V e r l a u f d e r Q u e r s t r e i f u n g

Am Grundaufbau der kontraktilen Fibrillen sind grundsätzlich keine wesentlichen Veränderungen gegenüber den Kontrollgruppen zu erkennen. Wie bei den Frischfleischproben zeigen auch bei aufgetautem Gefrierfleisch wiederum sämtliche Myofibrillenbündel erhebliche Variationen sowohl in der Längsausdehnung als auch in der Ausgestaltung ihrer Untereinheiten.

Die bekannte, unterschiedlich ausgeprägte "Sanduhrform" der kontrahier-

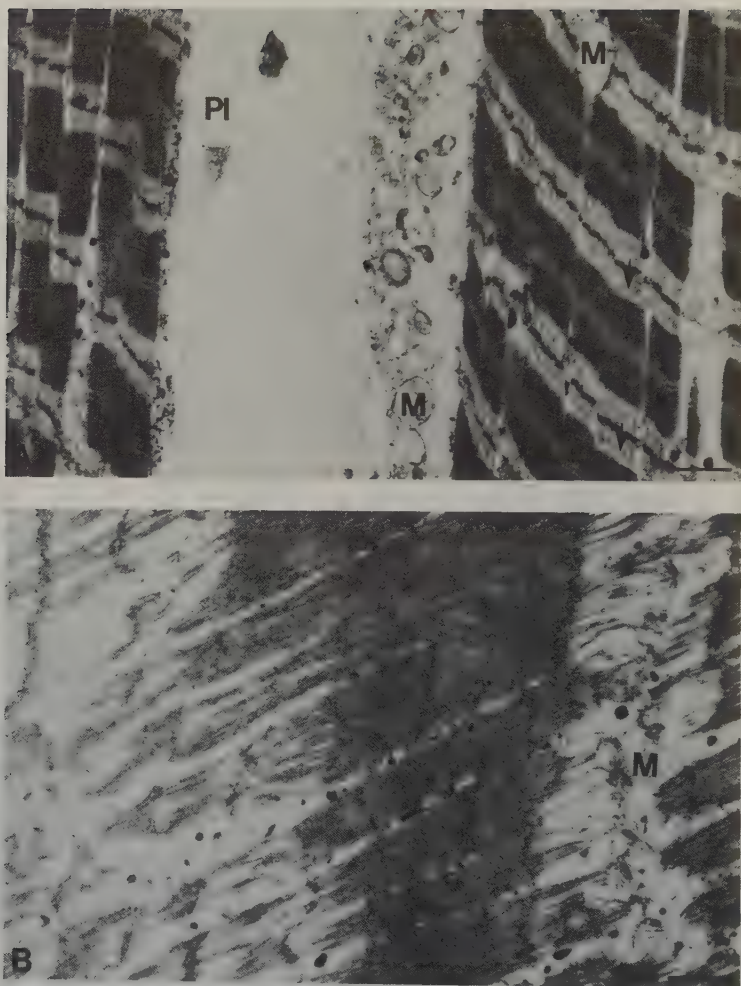


Abb. 15: Verschiedene Kontraktionszustände und Zerstörungsgrade myozellulärer Strukturen nach 240-stündigem Gefrier- und anschließendem Auftauprozess

- (A) ausgeprägte Spindelform der in Lysis befindlichen Sarkomere, zusätzliche, geringfügig dichtere Zone innerhalb der I-Banden (▼), Plasmalemmablösungen und -zerreissungen, subplasmalemmale Ansammlung degenerierter Zellorganellen
- (B) stark kontrahierte Sarkomere mit extremen filamentären Zerreißen und Längsspaltenbildungen, deutlich verbreiterte Z-Scheiben

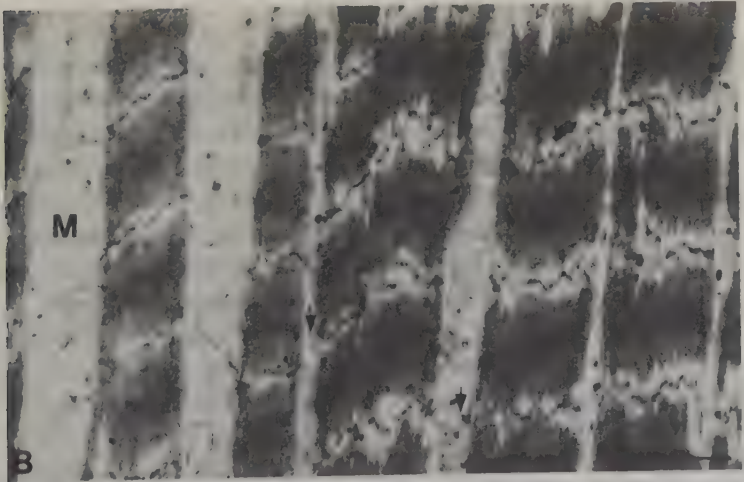
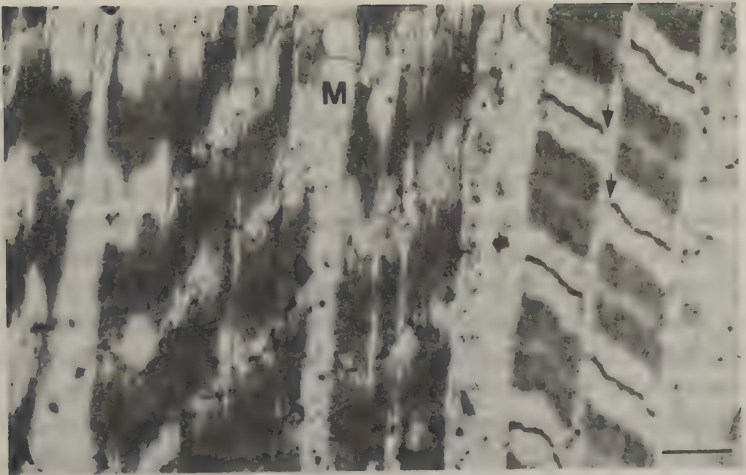


Abb. 16: Sarkomere nach 240-stündiger Gefrierlagerung und anschließendem Auftauprozess in unterschiedlichem Erhaltungszustand
Extrem ungleichmäßiger Abstand der Myofibrillen, vakuolig degenerierte Mitochondrien, Zerreißen der Aktinfilamente
(A) gleichzeitiges Auftreten intakter, stufenförmig versetzter Z-Scheiben (▼) und zerrissener, stark verzerrter Z-Scheiben
(B) bizarr geformte Z-Scheiben mit Verlust der filamentären Brückenbildung (▼) benachbarter Z-Scheiben

ten Sarkomere geht wie schon bei den Kontrollproben einher mit dem Verlust der charakteristischen Bandengliederung: I- und A-Bande sind nicht mehr oder nur undeutlich gegeneinander abgrenzbar. M- und H-Streifen sind nur andeutungsweise ausgebildet. Die Z-Scheiben sind deutlich verbreitert und zeigen eine unscharfe Konturierung. Vereinzelt auftretende Verzerrungen in den Z-Scheiben sind bevorzugt an Zerrei-
stungsstellen von Myofilamenten nachweisbar oder sie sind durch Längs-
spaltenbildungen divergierend verlaufender Filamente bedingt. Dort,
wo ganze Myofibrillen gegeneinander versetzt sind, geht die Verbindung
benachbarter Z-Streifen völlig verloren, die filamentären Reste einer
ehemaligen Verknüpfung liegen nur noch an einem Ende des Z-Streifens
haftend in den verbreiterten Interfibrillärspalten (Abb. 15 B).
Häufiger als im ungefrorenen Zustand treten jetzt Abschnitte mit zer-
rissenen und ungeordneten Myofibrillen ("Trümmerzonen") auf, die keine
Querstreifung mehr erkennen lassen (Abb. 15 B).

Bei den in Lysis befindlichen, spindelähnlich umgeformten Sarkomeren,
kann wieder eine deutliche Untergliederung in Untereinheiten festge-
stellt werden, die aber nicht mit der sonst üblichen Bandenunterteilung
übereinstimmt. Die breiten, deutlich ausgebildeten, aber nicht immer
scharf begrenzten I-Banden zeigen oftmals beidseits der Z-Streifen
eine elektronenoptisch geringfügig dichtere Zone. In den A-Banden kön-
nen vereinzelt zusätzliche schmale, elektronenmikroskopisch dichte
Bänder in unmittelbarer Nähe der H-Streifen nachgewiesen werden.
Die Z-Scheiben erscheinen dünn, dicht und überwiegend unscharf verlau-
fend. Es treten Schädigungen ihrer filamentären Bauelemente auf, welche
zu einem unregelmäßig gezackten Verlauf der Z-Scheiben führen können
(Abb. 16 A u. B).

Diese gegenüber den Kontrollproben relativ häufiger vorkommenden Zusam-
menhangstrennungen haben eine Verschiebung der einzelnen Myofibrillen
und eine stufenförmige Versetzung der Z-Scheiben zur Folge (Abb. 16 A
u. B).

P l a s m a l e m m

Diese Zellmembran ist nur noch selten als völlig intakte, geschichtete Grenzmembran erhalten. Sie verliert an vielen Stellen den Kontakt zu den Myofibrillen und kommt oftmals als frei liegende Membran im interzellulären Raum zu liegen (Abb. 14 A, 15 A). Durch die häufig ausgeprägte Ablösung des Plasmalemm wird Raum geboten für die vermehrte Ansammlung unterschiedlichster Zellfragmente und dicht granulierter Flocken. An diesen Stellen treten auch erhebliche Integritätsverluste und Rupturen auf, durch welche Zytoplasmabestandteile und zelluläre Flüssigkeit in Form von feingranulärem, leicht osmiophilem Material verschiedener Dichte in die extrazellulären Spalträume austreten können (Abb. 14 A).

Auch in die interfibrillären Spalträume findet ein Flüssigkeitsübertritt in erheblichem Umfang statt.

I n t e r z e l l u l a r r a u m

Die Interzellularräume sind innerhalb der Primärbündel oft verschwindend eng und erweitern sich insbesondere zwischen einzelnen Muskelfaserbündeln erheblich. In diesen erweiterten Sarkoplasmaräumen finden sich unterschiedlich stark deformierte Zellorganellen bzw. deren Reste, kleine Myelinkörper mit osmiophilem Inhalt und unregelmäßig geformte, elektronenoptisch dichte Einschlüsse.

Vereinzelt sind verzerrte oder rupturierte Kollagenfasern nachweisbar.

Tabellarische Gegenüberstellung (Tab. VI) der Ergebnisse der einzelnen Bewertungsmaßstäbe (0-2) für Zerreißungen und Längs- und Querauffaserung bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=8)

Kontrollgruppe (K)/ Versuchsgruppe (V) der verschiedenen Teilstücke a-b-c		Tier-Nr.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Zerreißungen	Ka	0	1	0	1	0	0	0	0
	Va	1	1	1	2	2	2	2	2
	Kb	0	1	0	0	0	0	0	0
	Vb	1	1	2	2	2	2	2	1
	Kc	0	0	0	0	0	1	0	0
	Vc	1	1	2	2	1	2	2	2
Längsauf- faserung	Ka	0	1	2	1	0	1	0	0
	Va	1	0	2	1	0	2	1	2
	Kb	0	1	0	0	1	1	0	1
	Vb	1	2	2	1	1	2	1	2
	Kc	0	1	0	0	1	1	0	1
	Vc	1	1	2	2	1	2	1	2
Querauf- faserung	Ka	0	0	1	0	0	0	0	0
	Va	1	0	0	1	0	2	1	1
	Kb	0	1	0	0	0	0	0	0
	Vb	1	1	1	1	1	2	2	1
	Kc	0	1	0	0	0	1	0	0
	Vc	1	1	2	1	1	1	1	1

Tabellarische Gegenüberstellung (Tab. VII) der Ergebnisse der einzelnen Bewertungsmaßstäbe (0-2) für Kernveränderungen, Plasmalemm/Myolemmveränderungen und interstitielle Bindegewebsalterationen bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=6)

Kontrollgruppe (K)/ Versuchsgruppe (V) der verschiedenen Teilstücke a-b-c		Tier-Nr.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Kernveränderungen	Ka	0	0	0	0	0	0	0	0
	Va	0	0	1	0	1	1	1	1
	Kb	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vb	0	1	1	0	1	1	1	1
	Kc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vc	0	1	1	1	1	0	1	1
Plasmalemm/ Myolemmveränderungen	Ka	1	1	0	0	0	0	0	0
	Va	1	1	1	1	1	2	1	2
	Kb	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vb	1	0	2	1	1	2	2	2
	Kc	1	1	0	0	0	0	0	0
	Vc	1	0	2	1	1	1	1	1
interstitielle Bindegewebsalterationen	Ka	0	0	0	0	0	0	0	0
	Va	2	1	1	1	1	2	1	2
	Kb	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vb	2	1	2	1	1	2	2	2
	Kc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vc	1	1	2	1	1	2	1	2

Tabellarische Gegenüberstellung (Tab. VIII) der Ergebnisse der einzelnen Bewertungsmaßstäbe (0-2) für Fleischsaftmenge und Fleischsaftlokalisation bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=8)

		Kontrollgruppe (K)/ Versuchsgruppe (V) der verschiedenen Teilstücke a-b-c		Tier-Nr.							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Fleischsaft- menge	Ka			0	0	0	0	0	0	0	0
	Va			1	2	2	2	2	2	2	2
	Kb			0	0	0	0	0	0	0	1
	Vb			1	1	1	2	2	1	2	1
	Kc			0	0	0	0	1	0	0	0
	Vc			2	2	2	1	2	2	2	2
Fleischsaftlo- kalisation	Ka			x	z	v	w	v	v	z	z
	Va			z	wxyz	z	xyz	z	wxz	wxz	wx
	Kb			z	xz	z	v	v	wz	z	w
	Vb			yz	wz	w	wxz	wz	xz	z	wz
	Kc			z	z	v	w	w	w	z	v
	Vc			yz	wz	wz	wxz	xz	wxz	wz	wz

Tabellarische Gegenüberstellung (Tab. IX) der Ergebnisse der einzelnen Bewertungsmaßstäbe (0-2) für Fettzellveränderungen bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=8)

Kontrollgruppe (K)/ Versuchsgruppe (V) der verschiedenen Teilstücke a-b-c		Tier-Nr.							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Fettzellver- änderungen	Ka	0	0	0	0	0	0	0	0
	Va	0	1	0	1	1	2	1	1
	Kb	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vb	1	0	1	1	1	1	2	2
	Kc	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vc	0	0	1	1	1	1	1	1

Tabellarische Zusammenstellung (Tab. X A) der morphometrischen Auswertung der Anzahl der Sarkomeren/Messeinheit bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=8)

Tier Nr.	Teil- stück	Minimum	Maximum	Mittelwert n=20	Mittelwert Ka,b,c bzw. Va,b,c	SD
1	Ka	14	17	16,3	13,10	1,1
	Kb	9	16	13,8		2,6
	Kc	8	11	9,2		0,9
	Va	14	18	15,1	13,00	1,5
	Vb	12	15	14,1		1,1
	Vc	8	13	9,8		1,3
2	Ka	12	15	13,5	12,23	1,1
	Kb	9	15	10,8		1,1
	Kc	11	15	12,4		1,5
	Va	11	16	13,2	12,93	1,6
	Vb	12	17	12,4		0,6
	Vc	10	16	13,2		2,6
3	Ka	13	16	15,2	14,13	1,2
	Kb	11	15	13,9		1,1
	Kc	10	15	13,3		1,7
	Va	11	13	12,3	12,46	0,8
	Vb	12	14	13,3		0,8
	Vc	10	14	11,8		1,5

Tabellarische Zusammenstellung (Tab. X B) der morphometrischen Auswertung der Anzahl der Sarkomeren/Meßeinheit bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25 °C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=8)

Tier Nr.	Teil- stück	Minimum	Maximum	Mittelwert n=20	Mittelwert Ka,b,c bzw. Va,b,c	SD
4	Ka	9	13	10,4	11,50	1,5
	Kb	8	11	9,8		0,9
	Kc	12	16	14,3		1,4
	Va	9	11	10,2	14,46	0,7
	Vb	11	19	14,0		3,6
	Vc	17	22	19,2		2,1
5	Ka	9	12	10,1	11,95	0,8
	Kb	11	19	14,5		2,5
	Kc	8	16	11,2		2,1
	Va	10	11	10,6	12,93	0,5
	Vb	16	18	16,6		0,8
	Vc	9	14	11,6		2,0
6	Ka	11	16	12,9	12,20	1,7
	Kb	10	15	13,0		1,5
	Kc	9	12	10,7		0,8
	Va	9	14	11,4	11,36	1,6
	Vb	8	17	10,8		1,9
	Vc	10	16	11,9		1,7

Tabellarische Zusammenstellung (Tab. X C) der morphometrischen Auswertung der Anzahl der Sarkomeren/Messeinheit bei Frischfleisch (Kontrollgruppe K) und aufgetautem Gefrierfleisch nach 240-stündiger Lagerung bei -25°C (Versuchsgruppe V) beim Schwein (n=8)

Tier Nr.	Teil- stück	Minimum	Maximum	Mittelwert n=20	Mittelwert Ka,b,c bzw. Va,b,c	SD
7	Ka	15	26	18,8	16,03	3,2
	Kb	12	15	13,5		0,7
	Kc	11	20	15,8		2,9
	Va	12	15	14,1	13,83	1,1
	Vb	11	16	13,6		1,1
	Vc	9	22	13,8		2,5
8	Ka	9	12	10,1	11,26	1,1
	Kb	10	13	11,6		1,2
	Kc	10	14	12,1		1,6
	Va	8	11	10,0	11,16	1,2
	Vb	10	13	11,5		1,0
	Vc	10	16	12,0		2,4

5. DISKUSSION

Gegenstand vorliegender Untersuchungen war, die Auswirkungen des gewerblich angewandten Gefrierprozesses auf Skelettmuskelgewebe von Schweinen histomorphologisch zu erfassen.

Zur exakten Unterscheidung von Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch war es vorab zwingend notwendig, die unmittelbar postmortal ablaufenden Vorgänge zu charakterisieren und die bereits in dieser Rigor- und Postrigorphase auftretenden Veränderungen wissenschaftlich zu erfassen.

Auf eine Kontrollgruppe zur Darstellung der schlachtfrischen Muskelstrukturen konnte verzichtet werden, da zur Differenzierung der strukturellen Veränderungen 24 Stunden gelagerter Frischfleischproben der sogenannte Normalzustand unbehandelten Muskelgewebes zugrundegelegt werden konnte.

Die 24 Stunden post mortem entnommenen Proben weisen nur geringfügige strukturelle Abweichungen vom charakteristischen Bild des quergestreiften Muskels auf. Dies erklärt sich damit, daß während der eintägigen Rigor mortis Phase bei $+4^{\circ}\text{C}$ der pH-Wert nur langsam abnimmt, die Aktivität einiger Enzyme zurückgeht und die Proteolyse nur sehr langsam einsetzt (VANA et al., 1982).

Bindegewebsalterationen und Fettzellveränderungen sind in dieser Phase zu vernachlässigen. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß extrazelluläre Strukturen durch die Reifungsvorgänge erst dann angegriffen werden, wenn die Muskelzellmembran für die abbauenden Enzyme durchlässig geworden ist. Im vorliegenden Versuch ist dies erst einige Tage nach dem Schlachten der Fall (HECHT, 1987).

Bei diesen Frischfleischproben dominiert als Charakteristikum der ausserordentlich uneinheitliche Kontraktionszustand der Sarkomere. Eine Erklärung dafür, daß diese postmortalen Reaktionsabläufe bei sämtlichen Proben hochgradig variieren, könnte in der unterschiedlichen physischen und psychischen Erschöpfungssituation der einzelnen, zufällig ausge-

wählten Tiere vor und während des Schlachtvorganges zu suchen sein: Nach Angaben von HAMM et al. (1984) ist die ATP-Menge im postmortalen Muskelgewebe von entscheidender Bedeutung für die Rigorentstehung. Bei streßanfalligen und empfindlichen Schweinen, die je nach energetischer Ausgangslage mit veränderten Stoffwechselvorgängen, insbesondere mit vermehrtem ATP-Verbrauch und beschleunigter Glykogenolyse reagieren (RICHTER et al., 1985), ist der ATP-Vorrat wesentlich schneller erschöpft als bei stressresistenten Tieren. In höchstem Maße differierende Kontraktionszustände als Ausdruck des unterschiedlichen energetischen Status der Muskelzellen zum Zeitpunkt der Probenentnahme sind die Folge. Die Tatsache, daß extrem gelöste und kontrahierte Sarkomere unmittelbar nebeneinander im selben Schnittpräparat vorkommen, könnte mit einer unterschiedlichen Enzymaktivität dieser Zellen erklärt werden (KHAN, 1976).

Neben prämortalen Faktoren müssen auch postmortale, wie die Geschwindigkeit des Kühlens oder die Art und Weise des Aufhängens der Schlachtierkörper (HONIKEL, 1983) berücksichtigt werden. Gerade diese Parameter nehmen im stärksten Maß Einfluß auf die Stoffwechselbilanz des Muskelgewebes und damit auf den Kontraktionszustand der Sarkomere.

Der Gliederungsverlust der im Rigor befindlichen Sarkomere, insbesondere das Verschwinden der I-Bande, ist auf das langsame Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente zurückzuführen. Dieser Mechanismus wird durch den intrazellulären Anstieg der Ca^{++} -Konzentration in Gang gesetzt. Die damit verbundene Konzentrationserhöhung hat ihre Ursache in einem Funktionsverlust der Calziumpumpe bei niedrigen Temperaturen, durch welche die aus dem SR ausgetretenen Ca^{++} -Ionen nicht wieder zurücktransportiert werden (BENDALL, 1973).

Unterstützt wird dieser Vorgang durch einen zusätzlichen anaeroben Ca^{++} -Efflux aus den Mitochondrien (HAMM, 1979).

Die Erhöhung der Ca-Konzentration führt schließlich zur Aufhebung des Troponin-I-Hemmeffekts und der sterischen Behinderung der Aktin-Myosin-Interaktion. Dadurch tritt eine Aktivierung des kontraktile Systems ein (HAMM, 1981).

Die Verbreiterung und undeutliche Abgrenzbarkeit der Z-Scheiben bei

den kontrahierten Sarkomeren ist vermutlich durch eine Komprimierung der Z-Scheiben Proteine hervorgerufen und das Anstoßen der Myosinfilamente an der Z-Scheibengitterstruktur bedingt. Die Z-Linien weißer Muskeln sind besonders anfällig für destruktive postmortale Veränderungen (LAWRIE, 1980).

Sobald die Lösung der Totenstarre einsetzt und Aktin- Myosinfilamente aufbrechen, erfolgt wieder eine Sarkomerengliederung in die bekannten Untereinheiten. Bei einigen in Lysis befindlichen Sarkomeren können zusätzliche Zonen innerhalb der I-Banden auftreten. Dies könnte möglicherweise im Zusammenhang mit dem Phänomen des "cold-shortening" gesehen werden, insbesondere, da DRANSFIELD und LOCKYER (1985) zeigen konnten, daß Kältekontraktur beim *M. longissimus dorsi* vom Schwein bei einer Kühlung von $+3^{\circ}\text{C}$ und darunter, nicht jedoch bei $+5^{\circ}\text{C}$ und darüber eintritt. Bei dunkleren (roten) Schweinemuskeln werden die Veränderungen bereits unter $+6^{\circ}\text{C}$ beobachtet (FISCHER et al., 1980).

LOCKER (1983) ist der Meinung, daß beim kälteverkürzten Muskel die gap-Filamente im Bereich der I-Banden durch die Überlappung der Filamente nicht mehr frei sind und daher nicht mehr abgebaut werden können. In den vorliegenden Untersuchungen ist nicht bekannt, ob die zur Untersuchung gelangten Proben bereits vor Eintritt der Totenstarre auf $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß Kälteverkürzung für das vereinzelte Auftreten der elektronenoptisch dichten Zonen in den I-Banden verantwortlich ist.

Bei allen untersuchten Proben fällt auf, daß die im Rigor mortis befindlichen Sarkomere weitaus häufiger und auch intensiver geschädigt sind als die gelösten Sarkomere. Dies liegt vermutlich an der unterschiedlichen Festigkeit der Aktin- und Myosinfilamentverbindungen bzw. der Quervernetzungen anderer Strukturproteine, die während der Verkürzungsphase wesentlich ausgeprägter vorhanden ist als während der Lösungsphase. So haben die Bauelemente der stark kontrahierten Sarkomere durch die in ihnen stärker auftretenden Zug- Schub- und Scherkräfte eine geringere Möglichkeit, einwirkenden Störfaktoren ohne Schädigung entgegenzuwirken als die gelösten Sarkomere.

Unterschiedliche Merkmale zur Identifizierung der einzelnen Proben-teilstücke (Hals, Kotlett, Schinken) sind erwartungsgemäß nicht aufgetreten, da die drei untersuchten Muskeln (*M. longissimus dorsi*, *M. serratus ventralis*, *M. semimembranosus*) keine grundsätzlich unterschiedlichen strukturellen Eigentümlichkeiten besitzen.

Die postmortale Fleischreifung wird durch den Gefriervorgang unterbrochen, da das Lösungs- und Transportmittel Wasser den proteolytischen Enzymen nicht mehr zur Verfügung steht. Nach dem Auftauprozess laufen die Reifungsvorgänge in gewohnter Weise weiter. Es kommt zur Fortsetzung der Proteinspaltung mit anschließender Auflockerung der Muskelstruktur. Damit erklärt sich das nach dem Gefrier- und Auftauzyklus unverändert variable Vorkommen unterschiedlich kontrahierter bzw. gelöster Sarkomere in den untersuchten Proben.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Untersuchungsergebnissen von HECHT (1987) überein. Er stellte darüberhinaus fest, daß der Reifungsvorgang durch die Veränderung der Zellmembran während des Gefrier- und Auftauprozesses nach dem Auftauen sogar beschleunigt ablaufen kann.

Angesichts der Tatsache, daß gefrorenes Fleisch als Eis- Wasser- Fettstoff- System in einem dynamischen Zustand betrachtet werden muß, in welchem enzymatische, chemische und physikalische Veränderungen eintreten können, war bereits vor Versuchsbeginn klar, daß Gefrierschädigungen zu erwarten sein würden. In der Tat wurde ein signifikanter Anstieg der Faserzerreissungen quer zur Längsrichtung und eine Zunahme der Plasmalemm/Myolemmablösungen bzw. Integritätsverluste der Zellmembran nachgewiesen. Dies dürfte im Wesentlichen der bei -25°C auftretenden extrazellulären und eventuell intrazellulären Eisbildung und der gleichzeitigen Dehydratation zuzuschreiben sein. Dies ist auf eine osmotisch bedingte Wanderung des Wassers aus den Muskelzellen in den interzellulären Raum zurückzuführen (HAMM et al., 1985).

Die Eiskristalle sind in der Lage, die Membranen mechanisch zu schädigen und Zusammenhangstrennungen der Myofilamente zu verursachen. Die Dehydratation bewirkt eine Verminderung des zellulären Volumens und eine Konzentrierung der Salzionen im nicht ausfrierenden Teil des Ge-

webewassers und kann gleichfalls eine Desintegration der Zellmembranen zur Folge haben. Es kommt zum vermehrten Austritt des Zellwassers in den Extrazellularraum.

Möglicherweise ist die ebenfalls beobachtete, auffällige Verringerung des Abstandes benachbarter Muskelfasern auf eine Komprimierung der Faserbündel durch die in den breiten Interzellularräumen liegenden Eiskristalle zurückzuführen. Es ist vorstellbar, daß Zellwasser zu Beginn des Gefriervorganges aufgrund des entstehenden osmotischen Gradienten zunächst die Fasern an bereits vorhandenen Öffnungen, das heißt, an den Schnittkanten der Präparate verläßt und in präformierte Räume, wie zum Beispiel breite Bindegewebsspalten, fließt. Dort kristallisiert es aus und schlägt sich an den bereits gebildeten Eiskristallen nieder. Diese üben einen vermehrten Druck auf die angrenzenden Fasern aus und bewirken das Zusammenrücken der oftmals intakten Muskelzellen, sodaß lichtoptisch der Eindruck entsteht, sie seien miteinander "verklebt". Denkbar ist auch, daß dieses Bild der extremen Aneinanderlagerung einzelner Fasern noch verstärkt wird durch den Auftauprozess. Die vorher geschrumpften Fasern nehmen teilweise wieder ausgetretenes Zellwasser auf und vergrößern damit ihr Volumen, für das sie nun aber weniger Raum zur Verfügung haben.

Dieser Mechanismus der erneuten, partiellen Wiederaufnahme der aufgetauten, extrazellulären Flüssigkeitströpfchen kann zu einer Veränderung der hydrostatischen Druckverhältnisse führen und kommt damit ebenfalls als Ursache für Zusammenhangstrennungen der Myofibrillen und Dehnungen und Zerreißen des Plasmalemmis in Frage.

Das bei aufgetauten Gefrierproben vermehrt nachweisbare Auftreten von freiem Fleischsaft scheint jedenfalls die Folge einer unvollständigen Wiederaufnahme des extrazellulären Wassers zu sein (GONZALEZ-SANGUINETTI, 1985).

Die oftmals zu beobachtenden Überdehnungen bzw. Rupturen der aus Connectin und Desmin bestehenden Filamente, welche die Z-Linienperipherie benachbarter Myofibrillen miteinander verketten, dürften die Folge der kältebedingten Sensibilisierung dieser Proteinstrukturen und einer ansteigenden mechanischen Belastung im Sinne einer räumlichen und elek-

trostatischen Verlagerung der myofibrillären Proteinbausteine sein.

Auch das Bindegewebe wird durch die veränderten physikalischen Belastungen mehr oder weniger umfangreich in Mitleidenschaft gezogen und weist Auflockerungen der Struktur und Kollagenfaserzerreissungen auf. Da ihre Stütz- und Hüllfunktion und die Festigkeit des gesamten Gewebes dadurch an einigen Stellen verloren geht, wird den Sarkomeren die Möglichkeit gegeben, teilweise extrem starke Lysisstadien einzunehmen. Fettzellalterationen treten nur in Gewebebezirken auf, in denen Zerstörungen nachweisbar sind. Bevorzugt sind dann einzeln oder in kleinen Gruppen vorkommende Fettzellen betroffen. Dies kann damit erklärt werden, daß Fettzellen in größeren Verbänden durch ihre hohe Elastizität ein höheres mechanisches Puffervermögen besitzen, das auftretende Spannungen und Krafteinwirkungen besser abfangen kann als einzelne Zellen.

Die Zellorganellen, insbesondere die Mitochondrien zeigen im Untersuchungszeitraum bemerkenswerte strukturelle Eigentümlichkeiten, bzw. unterschiedlich starke Degenerationserscheinungen. Bei den 24 Stunden bei +4°C kühlgelagerten Proben können bereits vereinzelt gequollene Mitochondrien mit Integritätsverlusten auftreten, deren Schadensursache in ihrer Funktion als Calciumreservoir zu suchen ist (CARAFOLI et al., 1975). Die durch den zunehmenden postmortalen Funktionsverlust ansteigende zytoplasmatische Ca-Konzentration führt zu einer intramitochondrialen Speicherung von Ca^{++} -Ionen in Form von Salzen. Der dadurch entstehende osmotische Gradient zieht ein passives Einströmen zytoplasmatischer Flüssigkeit nach sich und bewirkt so eine vakuolige Schwellung der Sarkomeren mit unscharf gezeichneten Cristae mitochondriales.

Die schädigenden Einflüsse des Gefrier- und Auftauvorganges äußern sich morphologisch in einer quantitativen und qualitativen Zunahme des Schwellungszustandes, einer zunehmenden Auflockerung der Innenstruktur mit "verschwommener" elektronenoptischer Darstellung bzw. der völligen Zerstörung der Innenleisten und Rupturen der Außenmembra-

nen.

Für diese Organellendegeneration wird der bereits bei kühl gelagerten Proben auftretende, kompensatorische Wasserinflux verantwortlich gemacht. Dieser tritt ein durch veränderte Permeabilitäts- und Transporteigenschaften der Membranen, und durch Verschiebung der intramitochondrialen Ionenkonzentration, sowie durch Dehydratation der Zelle während des Einfrierens (LACOURT und CARPENTER, 1973; HAMM, 1979).

Die zur Identifizierung und Unterscheidung myozellulärer Chemostrukturen herangezogene Methode der Lektin-Inkubation zeigt einige neue Gesichtspunkte auf, Frischfleisch und Gefrierfleisch morphologisch zu unterscheiden. Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß für die praktische Nutzenanwendung noch nicht alle Aspekte der zellulären Reaktionskette geklärt sind.

Gemeinsam ist allen 14 angewandten Lektinen, daß sich mit ihnen nur extrazelluläre Gewebestrukturen anfärben lassen.

Dies wird durch die Ergebnisse von CAPALDI et al. (1985) unterstrichen. Auch sie konnten keine positive Farbreaktion intrazellulärer Strukturen in normaler Muskulatur nachweisen.

Ansonsten sind die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen uneinheitlich. Dies ist auf den sehr unterschiedlichen strukturellen Aufbau der getesteten Lektine und die daraus resultierenden unterschiedlichen Spezifitäten für freie, terminale Monosaccharidreste zurückzuführen (CAPALDI et al., 1985). Die einzige strukturelle Gemeinsamkeit der Lektinmoleküle besteht darin, daß sie über mindestens zwei Kohlenhydratbindungsstellen verfügen. Da die chemische Struktur dieser Bindungsstellen bei allen 14 Lektinen differiert, ist sie determinierend für die jeweilige Spezifität der Lektine (ROTH, 1978; GALLAGHER, 1984).

Das negative Färbeverhalten von GS1, GS2, HPA, MPA, PNA, SBA und UEA2 sowohl vor als auch nach der Gefrierbehandlung des Fleisches erklärt sich somit aus einer fehlenden Affinität der Kohlenhydratbindungsstellen dieser Lektine zu Monosaccharidresten des Muskelgewebes.

Die Frage ist nun, warum die positiven, Lektin-inkubierten Organproben eine derart erhebliche Diskontinuität und Variabilität der Fluoreszenz-

Farbreaktion aufweisen. Möglicherweise bieten die Untersuchungsergebnisse von DEBRAY et al. (1981) eine Erklärung. Danach besitzen Lektine, die bisher "identisch" bezüglich ihrer Monosaccharid-Spezifität galten, durchaus die Fähigkeit, feinste Unterschiede in komplexen Proteoglykanstrukturen zu erkennen. Das zeigt, daß trotz der einzelnen Zucker-Spezifitäten der Lektine, die zweifellos absolut sind, sehr wohl die Möglichkeit besteht, mit verschiedenen Reaktionspartnern und verschieden heftig zu reagieren.

Darüberhinaus werden durch den Gefrier- und Auftauprozess die Muskelstrukturen sicherlich nicht nur histomorphologisch, sondern stellenweise auch chemisch verändert. Die Alteration der Quartär- oder Tertiärstruktur könnte schon ausreichen, um eine in Spezifität und Intensität differierende Farbreaktion hervorzurufen. Eine genaue und definitive Analyse dieser Ergebnisse kann nur durch exakte und ausreichende chemische Serienuntersuchungen erbracht werden. Dies war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht angezeigt.

Zwei Lektine machen eine Ausnahme bezüglich der Uneinheitlichkeit des Färbungsmusters:

1. WGA: es färbt alle im Ergebnisteil genannten Strukturen nach 24-stündiger Lagerung und Kältebehandlung gleichermaßen. Auch dafür fehlt eine wissenschaftliche Erklärung. Es liegt aber die Vermutung nahe, daß wiederum die Spezifitäten, und zwar nicht nur die Monosaccharid-Spezifitäten, sondern auch die Oligosaccharid-Spezifitäten des WGA, die Zugänglichkeit zum Reaktionspartner und die Glykan-Konformation (RAO et al., 1983), verantwortlich sind für sein Bindungsverhalten (2 Unter-einheiten mit Bindungsstellen für N-Acetylglucosamin, Molekulargewicht 34.000, Hauptspezifität $\text{GlcNAc}(\beta 1,4\text{GlcNAc})_{1-2} \text{BGlcNAc Neu5Ac}$; GOLDSTEIN und FORETZ, 1986). Es muß hypothetisch bleiben, ob gerade diese Saccharid-Strukturen durch Kälteeinwirkung unbeeinflusst bleiben.

2. BPA: es ist ein $\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}$ -spezifisches Lektin und färbt Bindegewebe, Gefäße und Fett bei 24 Stunden gelagertem Frischfleisch geringfügig an. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß viele extrazelluläre Gewebekomponenten des Muskels, insbesondere Kollagenfasern, vermehrt Oligosaccharide und Proteoglykane mit GalNAc -Resten enthalten.

Die Besonderheit des BPA ist, daß aufgetautes Gefrierfleisch

dagegen keine Färbung dieser Strukturen mehr zeigt. Es läßt sich wiederum nur vermuten, daß durch die Gefrierbehandlung bestimmte Glykoproteine sterisch nicht mehr in der Lage sind, dieses Lektin zu binden. Ob tatsächlich sterische Veränderungen verantwortlich sind für die nach Kälteeinwirkung fehlende Interaktion, müßte durch einen zusätzlichen Versuch mit in Lösung gebrachtem Muskelgewebe und BPA nachgewiesen werden (NILSSON und WAXDAL, 1978).

Abgesehen davon, daß die Gründe für dieses Färbeverhalten noch einer exakten wissenschaftlichen Klärung bedürfen, ist aufgrund des zu geringen Umfanges des Untersuchungsmaterials in dieser Arbeit noch keine endgültige Aussage zu treffen, ob mit dieser Methode tatsächlich eine neue Möglichkeit der Unterscheidung zwischen 24 Stunden gelagertem Frischfleisch und aufgetautem Gefrierfleisch (240 Stunden bei -25°C gelagert, 48 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufgetaut) gefunden wurde.

Um Fehlerquellen bei der Herstellung und Beurteilung der Lektin-Nachweise auszuschließen, wurden Lektin-Kontrollpräparate der Tunica mucosa von Rattenmägen nach dem gleichen Verfahren angefertigt und mit denen der Schweinemuskulatur verglichen.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß es grundsätzlich möglich ist, 24 Stunden kühlgelagertes Frischfleisch von aufgetautem Gefrierfleisch morphologisch zu unterscheiden.

Dazu müssen jedoch mehrere strukturelle Einzelkriterien herangezogen und beurteilt werden. Nur die Kombination der einzelnen licht- und elektronenmikroskopischen Bewertungsparameter erlaubt es, den Verdacht auf unbehandeltes bzw. kältevorbehandeltes Fleisch auszusprechen.

Von entscheidender Bedeutung für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist dabei in jedem Fall das Vorliegen eines strukturell einwandfreien, d.h., nicht durch äußere Einwirkungen physikalischer oder chemischer Art vorbehandelten Schlachttierkörpers als Ausgangsmaterial. Dem Einwand, daß bei diesem mit einer gewissen Subjektivität behafteten Auswertungssystem immer ein Interpretationsspielraum gegeben ist, kann nur durch entsprechend umfangreiche quantitative Untersuchungen begegnet werden.

Die Untersuchungen haben außerdem gezeigt, daß aufgetautes Gefrier-

fleisch möglicherweise auch histochemisch durch FITC-Lektin-Inkubation nachweisbar ist. Dies läßt sich jedoch nur durch weiterführende Serienuntersuchungen endgültig bestätigen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

An Hand von licht-, elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Methoden wurde die Auswirkung eines Gefrier- und Auftauprozesses auf die Struktur des Skelettmuskelgewebes beim Schwein untersucht.

Als Untersuchungsmaterial dienten der *M. longissimus dorsi*, der *M. serratus ventralis* und der *M. semimembranosus* von 8 handelsüblich geschlachteten Tieren.

Zunächst wurden die morphologischen Veränderungen von Fleischstücken dargestellt, die bis zur Probenentnahme 24 Stunden post mortem bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert waren (Kontrollgruppe K). Anschließend erfolgte das Einfrieren der Fleischteilstücke bei -25°C und die Lagerung der Proben bei gleicher Temperatur für insgesamt 240 Stunden. Sämtliche Fleischstücke wurden unmittelbar nach dem Auftauen ($+4^{\circ}\text{C}$) der üblichen histologischen Routinepräparation zugeführt (Versuchsgruppe V).

Die Resultate können wie folgt zusammengefaßt werden:

- 1) In Fleischproben der Kontrollgruppe (K) zeigt der Faserverlauf, die Faseranordnung, der Grad der Zerreißungen, die Längs- und Querauf-faserungen, das Ausmaß der Plasmalemmablösungen und der Grad der Bindegewebszerstörungen sowie die Menge des ausgetretenen Fleischsaftes lichtoptisch nur geringfügige Abweichungen vom Bau des nicht gelagerten quergestreiften Muskelgewebes.
- 2) Elektronenoptisch lassen sich die lichtoptischen Ergebnisse der Kontrollgruppen (K) bestätigen. Darüberhinaus ergibt sich bei kontrahierten Sarkomeren ein Verlust der Ordnung der Myofibrillenbündel und eine Dickenzunahme der Z-Scheiben. In Lysis befindliche Sarkomere weisen zusätzliche Umbauvorgänge innerhalb der I-Banden auf.
- 3) Fleischproben nach 240 Stunden Lagerung bei -25°C und nach einem

Auftauprozess bei $+4^{\circ}\text{C}$ (Versuchsgruppe V) weisen erhebliche Veränderungen auf:

a) lichtoptisch

- eine auffällige Abnahme der interfibrillären Zwischenräume
- ein weitgehender Verlust der parallelen Anordnung der Muskelfasern
- ein deutlicher Anstieg der Anzahl der Faserzerreissungen quer zur Faserlängsrichtung
- eine vermehrte Ablösung des Plasmalemmas/Myolemmas von der Muskelzelle und Integritätsverlust dieser Zellmembran
- Zunahme der Zerreißungen der Kollagenfasern, die eng mit der Zunahme der Muskelfaserzerreissungen korrelieren
- eine erhebliche Verdichtung der Kernstruktur mit einer erhöhten Anzahl an Kernpyknosen
- ein vermehrter Austritt von Fleischsaft, der bevorzugt Interzellularspalten und Zerreißungsstellen der Muskelfasern ausfüllt
- ein quantitativer Anstieg von Fettzelldeformationen

b) elektronenoptisch

- ein erheblicher bis vollständiger Verlust der Verbindungen benachbarter Z-Scheiben
- ein deutlicher Anstieg intrafibrillärer Spaltenbildungen bzw. Zerreißungen der Myofilamentbündel
- ein vermehrtes Auftreten degenerierter Mitochondrien, deren Innenstruktur aufgelockert und inhomogen mit unscharfen Cristae mitochondriales erscheint

4) Sämtliche Veränderungen treten in vergleichbar identischem Ausmaß in allen 3 Entnahmestellen beider Untersuchungsgruppen (K und V) auf.

5) Die morphometrischen Ergebnisse zeigen eine erhebliche Differenz des postmortalen Rigors 24 Stunden nach der Schlachtung der Tiere. Das Muskelgewebe ist zu diesem Zeitpunkt durch alle Zustandsformen

zwischen einer ausgeprägten Totenstarre bis zur völligen Lysis gekennzeichnet.

6) Der Gefrier- und Auftauprozess hat keinerlei Einfluß auf den Kontraktionszustand der Sarkomeren. Durch die Kältebehandlung bleiben die Sarkomeren im status quo des Zeitpunktes während des Einfriervorganges.

7) Die Lektin-Inkubation des Muskelgewebes mit an FITC gebundenem Bauhinia purpurea Agglutinin weist bei allen untersuchten Tieren bei 24 Stunden gelagertem Fleisch (K) eine geringfügige positive Fluoreszenzfärbung des Bindegewebes, der Gefäße und der Fettzellen auf. Bei aufgetautem Gefrierfleisch (V) dagegen liegt eine völlig negative Farbreaktion vor.

7. SUMMARY

CHANGES IN SKELETAL MUSCLE TISSUE AFTER INFLUENCE OF FREEZING -
A MORPHOLOGICAL COMPARISON BETWEEN FRESH MEAT AND THAWED FROZEN MEAT
OF THE SWINE

The effect of a freezing and thawing process on the structure of the skeletal muscle tissue of the swine was investigated by light-, electron-, and fluorescence microscopical methods.

The *M. longissimus dorsi*, the *M. serratus ventralis* and the *M. semi-membranosus* of eight commercially slaughtered animals served as material for the investigations.

First of all, the morphological changes of pieces of meat being stored at $+4^{\circ}\text{C}$ until the taking of samples 24 hours postmortem, were elaborated (control group K).

Afterwards the pieces of meat were frozen at -25°C and stored for 240 hours at this temperature. Immediately after thawing ($+4^{\circ}\text{C}$) all the pieces of meat were subjected to the customary histological routine preparation (test group V).

Established results:

1) The course and order of the fibres, the degree of the ruptures, the longitudinal and transversal separation of the myofibrils, the extent of the plasmalemma detachment and the degree of the destruction of the connective tissue within the control groups (K) only show slight deviations from the structure of unstored striated muscle fibres.

2) Light microscopical results of the control groups can be confirmed by electron microscopical investigations. Moreover, the contracted sarcomeres show a disorganisation of the myofibrillar bundles and an enlargement of the Z-discs. In addition to this, the sarcomeres in the state of lysis possess structural transformations within the I-bands.

3) Meat samples, stored at -25°C for 240 hours and thawed at $+4^{\circ}\text{C}$ (V), show significant alterations:

a) changes observed by light microscopy

- a striking decrease of the interfibrillar spaces
- a large loss of the parallel order of the muscle fibres
- a significant increase of the number of fibre-ruptures transversal to their longitudinal lines
- an increasing detachment of the plasmalemma/myolemma from the muscle cell and a loss of integrity of these cell membranes
- a growth of ruptures of the collagen fibres, which correlate closely to the growth of ruptures of the muscle fibres
- a considerable increase in the density of the nuclear structure with a rise in the number of nuclear pyknoses
- an increased release of intracellular water preferentially filling the intercellular spaces and ruptures of the muscle fibres
- a quantitative increase of deformations of the fat cells

b) changes observed by electron microscopy

- within a rather large up to a total loss of connections between adjoining Z-discs
- a significant increase of intrafibrillar spaces, respectively ruptures of the myofilament bundles
- an increased number of degenerated mitochondria, showing a swollen and inhomogeneous interior structure with blurred cristae mitochondriales

4) All changes in the three separated muscles of both investigation groups (K and V) occur within a comparatively identical extent.

5) The morphometric results show significant differences in postmortal rigor 24 hours after the slaughtering of the animals. At that time, the muscle tissue is characterised by showing all possible states from an entire rigor mortis to a total lysis.

6) The freezing and thawing process does not influence the state of contraction of the sarcomeres. Due to the freezing procedure the sarcomeres stay in their status quo, which they show during the freezing process.

7) The lectin-incubation of the muscle tissue by FITC-bound Bauhinia purpurea agglutinin showed in all investigated cases of 24 hours stored meat, a slight positive fluorescence-staining pattern of the connective tissue, the blood vessels and the fat cells. In comparison with it, the frozen and thawed meat shows an absolute negative staining reaction.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- ASHMORE, C.R., and L.DOERR, 1971: Comparative aspects of muscle fiber types in different species.
Exp. Neurol. 31, 408-418
- BARGMANN, W., 1977: Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- BARNARD, R.J., V.R.EDGERTON, T.FURNKAWA, and J.B.PETER, 1971: Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers.
Am. J. Physiol. 220, 410-414
- BENDALL, J.R., 1973: The biochemistry of rigor mortis and cold contraction.
Ber. 19. Europ. Fleischforscherkongreß, Paris, Bd. I, 1-27
- BENDALL, J.R., 1978: Electrical stimulation of carcasses as a method of avoiding the cold-shortening and toughness of meat.
Ber. 24. Europ. Fleischforscherkongreß, Kulmbach, Bd.II, 3-8
- BEUTLER, W., 1977: Über postmortale Vorgänge im Skelettmuskel, vor allem bei Schlachtschweinen (VI.).
Die Fleischwirtschaft, 8, 1481-1486
- BOURNE, G.H., 1960: The structure and function of muscle.
Bd.I, Structure, Academic Press, New York
- BUCHER, O., 1980: Cytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen. Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien
- BUEGE, D.R., and B.B.MARSH, 1975: Mitochondrial calcium and postmortem muscle shortening.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 478-482
- CALVELO, A., 1981: Recent studies on meat freezing. In: Developments in Meat Science, Ed: R.LAWRIE, Appl Science Publishers, London, New York, Bd.II

- CAPALDI, M.J., M.J.DUNN, C.A.SEWRY, and V.DUBOWITZ, 1984a: Altered binding of Ricinus communis I lectin by muscle membranes in Duchenne muscular dystrophy.
J. Neurol. Sci. 63, 129-142
- CAPALDI, M.J., M.J.DUNN, C.A.SEWRY, and V.DUBOWITZ, 1984b: Binding of Ricinus communis I lectin to the muscle cell plasma membrane in diseased muscle.
J. Neurol. Sci. 64, 315-324
- CAPALDI, M.J., M.J.DUNN, C.A.SEWRY, and V.DUBOWITZ, 1985: Lectin binding in human skeletal muscle: a comparison of 15 different lectins.
Histochem. J. 17, 81-92
- CARAFOLI, E., F.CLEMENTI, W.DRABIKOWSKI, and A.MARGRETH, 1975: Calcium transport in contraction and secretion.
Ed: A.MARGRETH, Amsterdam, Oxford, New York
- CERI, H., and D.ROBERTS, 1985: Endogenous lectins in normal and dystrophic muscle development.
Muscle & Nerve, 8, 710-713
- CLOSE, R.I., 1972: Dynamic properties of mammalian skeletal muscles.
Physiol. Rev. 52, 129-197
- DAVEY, C.L., and K.V.GILBERT, 1976: Thaw contracture and the disappearance of ATP in frozen lambs.
J. Sci. Food Agric. 27, 1085-1091
- DEBRAY, H., D.DECOURT, G.STRECKER, G.SPIK, and J.MONTREUIL, 1981: Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins.
Eur. J. Biochem. 117, 41-55
- DEN, H., D.A.MALINZAK, A.ROSENBERG, 1976: A lack of evidence for the involvement of a β -D-galactoside-specific lectin in the fusion of chick myoblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 621-627
- DILLER, K.R., E.G.CRAVALHO, and C.E.HUGGINS, 1972: Intracellular freezing of biomaterials.
Cryobiology 9, 429-440
- DRANSFIELD, E., and D.K.LOCKYER, 1985: Cold-shortening toughness in excised pork.
Meat Sci. 13, 19-32

- DUBOWITZ, V., and A.G.E. PEARSE, 1960: A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle.
Histochemie 2, 105-117
- DUCKWORTH, R.B., 1971: Differential thermal analysis of frozen food systems. I-the determination of unfreezable water.
J. Food Technol. 6, 317-327
- V. DÜRING, M., und K.H. ANDRES, 1969: Zur Feinstruktur der Muskelspindel von Mammalia.
Anat. Anz. 124, 566-573
- DUTSON, T.R., and L.D. YATES, 1978: Ultrastructural alterations in bovine muscle caused by high temperature and low pH incubation.
Ber. 24. Europ. Fleischforscherkongreß, Kulmbach, Bd. II, 51-56
- ENGEL, W.K., 1962: The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease.
Neurology 12, 778-794
- ENGEL, W.K., 1970: Selective and nonselective susceptibility of muscle fiber types.
Arch. Neurol. 22, 97-117
- FAHY, G.M., 1981: Simplified calculation of cell water content during freezing and thawing in nonideal solutions of cryoprotective agents and its possible application to the study of "solution effects" injury.
Cryobiology 18, 473-482
- FISCHER, C.H., J.U. BECKER, H.E. BLUM, B. BYERS, C. HEIZMANN, G.W. KERRICK, P. LEKKI, R.A. MALENCIK, and C. POCINWONG, 1976: Concerted regulation of glycogen metabolism and muscle contraction. In: Molecular basis of motility. Eds: L.M.G. HEILMEYER, J.C. RUEGY, and Th. WIELAND. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 137-158
- FISCHER, Ch., K.O. HONIKEL, und R. HAMM, 1980: Über das Auftreten der Kälteverkürzung ("cold-shortening") in dunkler und heller Muskulatur von Rind und Schwein.
Fleischwirtschaft 60, 263-265

- FRANKS, F., 1985: Biophysics and biochemistry at low temperatures.
Cambridge University Press, Cambridge, London, New York,
New Rochelle, Melbourne, Sydney
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., 1970: Natural variability in the length of
thin and thick filaments in simple fibers from a crab, portu-
nus depurator.
J. Cell Sci. 6, 559-592
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., 1976: The comparative structure of intracellu-
lar junctions in striated muscle fibers.
Exc. Med. Int. Congr. Ser. 404, 612-625
- FRANZINI-ARMSTRONG, C., and L.D. PEACHEY, 1981: Striated muscle - con-
tractile and control mechanism.
J. Cell Biology 91, 166-186
- GALLAGHER, J.T., 1984: Carbohydrate binding properties of lectins:
A possible approach to lectin nomenclature and classifica-
tion.
Biosci. Reports 4, 621-632
- GARTNER, T.K., and T.R. PODLESKI, 1975: Evidence that a membrane-bound
lectin mediates fusion of L₆ myoblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 972-976
- GAUTHIER, G.F., S. LOWEY, and A.W. HOBBS, 1978: Fast and slow myosin
in developing muscle fibers.
Nature (London) 274, 25-37
- GEROK, W., 1985: Die Bedeutung von Glykoproteinen und Lektinen in
der Gastroenterologie und Hepatologie.
Z. Gastroenterologie 23, 90-99
- GOLDSTEIN, I.J., 1980: Lectins: their nature and application.
Qualityline spring 1980 issue, Miles Laboratories (publisher)
- GOLDSTEIN, I.J., and R.D. FORETZ, 1986: Isolation, physicochemical charac-
terization, and carbohydrate-binding specificity of lectins.
In: The lectins: properties, functions and applications in
biology and medicine. Eds: I.E. LIENER, N. SHARON, I.J. GOLDSTEIN,
Academic Press, New York, London, 33-247

- GOLL,D.E., N.ARAKAWA, M.H.STROMER, W.A.BUSCH, and R.M.ROBSON, 1970: Chemistry of muscle proteins as a food. In: The physiology and biochemistry of muscle as a food II. Eds.: E.J.BRISKEY, R.G.CASSENS, B.B.MARSH, Madison, Milwaukee, London, 94-108
- GOLL,G., P.M.ROBSON, and M.M.STROMER, 1977: Muscle proteins. In: Food Proteins. Eds.: J.R.WHITAKER, and St.R.TANNENBAUM, AVI Publ. Co., Inc. Westport, Conn., 121-174
- GOMEZ,T.H., and A.CALVELO, 1982: On the ice growth mechanisms during beef freezing.
Refrigeration Sci. Technol., 1, 83-91
- GONZALEZ-SANGUINETTI,S., M.C.ANON, and A.CALVELO, 1985: Effect of thawing rate on the exsudate production of frozen beef.
J. Food Sci. 50, 697-700
- GREASER,M.L., 1977: Mechanism of calcium uptake and binding of sarcoplasmatic reticulum and mitochondria.
Proceed. 30th Ann. Recipr. Meat Confer. (AMSA), Auburn, 149-154
- GROSS,H., 1977: Gefrierätzung im Ultrahochvakuum (UHV) bei -196°C.
Diss. ETH 5881, Zürich
- GUTH,L., and F.J.SAMAH, 1969: Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle.
Exp. Neurol. 25, 138-
- GUTH,L., and R.W.ALBERS, 1970: The neural regulation of some phenotypic differences between the fiber types of mammalian skeletal muscle.
Exp. Neurol. 26, 126-
- HAMM,R., 1979: Die Biochemie des Muskelcalciums und ihre Bedeutung für die Fleischqualität, Teil 1.
Fleischwirtschaft 59, 393-398
- HAMM,R., 1981: Struktur und Funktion des Muskels.
Fleischwirtschaft 61, 1822-1829
- HAMM,R., P.GOTTESMANN, und J.KIJOWSKI, 1982: Einfrieren und Auftauen von Fleisch: Einflüsse auf Muskelgewebe und Tausaftbildung.
Fleischwirtschaft 62, 983-991

- HAMM, R., und P. GOTTESMANN, 1983: Freisetzung von Mitochondrien-Enzymen durch Gefrieren und Auftauen: Strukturelle und analytische Aspekte.
Ber. 28. Europ. Fleischforscherkongreß, Madrid, Bd. II, 152-155
- HAMM, R., K.O. HONIKEL, und C.J. KIM, 1984: Veränderungen im Schweine- und Rindermuskel nach dem Schlachten.
Fleischwirtschaft 64, 1387-1393
- HAMM, R., und P. GOTTESMANN, 1985: Lipoamiddehydrogenase, Citratsynthase und β -Hydroxylacyl-CoA-dehydrogenase des Skelettmuskels. VI. Einfluß des Gefrierens (-20°C) und Auftauens von Rinder- Kälber- Schweinemuskeln auf Aktivität und subzelluläre Verteilung.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 181, 121-127
- HAMM, R. und P. GOTTESMANN, 1985: Lipoamiddehydrogenase, Citratsynthase und β -Hydroxylacyl-CoA-dehydrogenase des Skelettmuskels. VIII. Einfluß von Temperatur und Geschwindigkeit des Gefrierens von Rindermuskel auf Aktivität und subzelluläre Verteilung der Enzyme im aufgetauten Gewebe.
Z. Lebensm. Unters. Forsch. 181, 210-216
- HAMMERSEN, F., 1962: Das Gefäßmuster der Skelettmuskulatur. In: Probleme der Haut- und Muskeldurchblutung, Bad Oeynhauser Gespräche VI, Springer Verlag, Berlin (1964)
- HASL, G., und H. PAULY, 1971: Kalorische Eigenschaften des gebundenen Wassers in Proteinlösungen
Biophysik 7, 283-294
- HASSELBACH, W., 1977: The sarcoplasmatic calcium pump - A most efficient ion translocation system.
Biophys. Struct. Mechanism 3, 43-54
- HECHT, H., 1987: Reifung und Zartheit von Fleisch.
Fleischwirtschaft 67, 534-546
- HONIKEL, K.O., und R. HAMM, 1978a: Influence of cooling and freezing of minced muscle on the breakdown of ATP and glycogen.
Meat Sci. 2, 181-189
- HONIKEL, K.O., A. HAMID, Ch. FISCHER, and R. HAMM, 1981b: The influence of postmortem changes in bovine muscle on the water-holding capacity of beef. II. Postmortem storage of muscle at various temperatures between 0°C and $+30^{\circ}\text{C}$.
J. Food Sci. 46, 23-31

- HONIKEL, K.O., P. RONCALES, and R. HAMM, 1983: The influence of temperature on shortening and rigor onset in beef muscle.
Meat Sci. 8, 221-241
- HONIKEL, K.O., 1983: Berichterstattung vom 28. Europ. Fleischforscherkongreß, Madrid
Fleischwirtschaft 63, 880-883
- HUXLEY, A.F., and R. NIEDERGERKE, 1954: Structural changes in muscle during contraction.
Nature, 173, 971-972
- HUXLEY, H.E., and J. HANSON, 1954: Changes in cross striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation.
Nature 173, 973-976
- IKEUCHI, Y., S.K. SUNG, and J.O. KANG, 1980: Effect of temperature on actin-myosin interaction during postmortem storage of muscle.
Proceed. 26th Europ. Meeting of Meat Res. Workers, Vol. 1, 61, Colorado Springs
- KAUFMAN, S.J., and M.L. LAWLESS, 1980: Thiodigalactoside binding lectin and skeletal myogenesis.
Differentiation 16, 41-48
- KHAN, M.A., J.M. PAPADIMITRION, P.G. HOLT, and B.A. KAKULAS, 1973: Further histochemical properties of rabbit skeletal muscle fibers.
Histochemie 36, 173-183
- KIM, C.J., 1984: Veränderungen im Schweinemuskel nach dem Schlachten und deren Bedeutung für das Wasserbindungsvermögen und Verarbeitungsseigenschaften des Fleisches.
Diss. Univ. Giessen
- KNOLL, P., 1891: Über protoplasmaarme und protoplasmareiche Muskulatur.
Denkschr. Akad. Wiss. Wien.
Math.-Nat. Kl. 58, 633
- KOCHMARAIIE, M., W.M. KENNICK, A.F. ANGLEMIER, E.A. ELGASIM, and T.K. JONES, 1984: Effect of postmortem storage on cold-shortened bovine muscle: Analysis by SDS-Polacrylamide gel electrophoresis.
J. Food Sci. 49, 290-291

- KOCHMARATIE, M., W.M.KENNICK, A.F.ANGLEMIER, E.A.ELGASIM, 1984: Effects of postmortem storage on muscle protein degradation: Analysis by SDS-Polacrylamide gel electrophoresis.
J. Food Sci. 49, 292-293
- KRISTIC, R.V., 1978: Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- LACOURT, M.A., and J.CARPENTER, 1973: Influence of ante rigor freezing and thawing temperature and time on beef muscle contraction.
Food Sci. Techn. Abstr. 4, 686
- LACOURT, A., und P.V.TARRANT, 1983: Glykogen Ab- und Aufbau in verschiedenen Skelettmuskelfasertypen von Jungbullen nach subkutaner Verabreichung von Adrenalin.
Ber. 28. Europ. Fleischforscherkongreß, Madrid, Bd. I, 68-73
- LAWRIE, R.A., 1970: Fleischkunde
BLV-Verlagsgesellschaft, München, Basel, Wien
- LEIBO, S.P., J.FARRANT, P.MAZUR, M.G.Jr.HANNA, and L.H.SMITH, 1970: Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: Interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol.
Cryobiology 6, 315-332
- LEVITT, J.A., 1962: A sulfhydryl-disulfid hypothesis of frost injury and resistance in plants.
J. Theor. Biol. 3, 355-391
- LIENER, I.E., N.SHARON, I.J.GOLDSTEIN, 1986: The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine.
Academic Press, New York, London
- LOCKER, R.H., and C.J.HAYGARD, 1963: A cold shortening effect on beef muscles.
J. Sci. Food Agric. 14, 787-793
- LOCKER, R.H., and N.G.LEET, 1975: Histology of highly stretched beef muscle I.
J. Ultrastruct. Res. 52, 64-75
- LOCKER, R.H., and N.G.LEET, 1976b: Histology of highly stretched beef muscle IV.
J. Ultrastruct. Res. 56, 31-38

- LOCKER, R.H., 1983: Ein neues Konzept der Fleischzartheit unter Einbeziehung der Gap-Filamente.
Ber. 28. Europ. Fleischforscherkongreß, Madrid, Bd.I, 117-120
- LORENZI, 1678: aus: GOLARZ DE BOURNE, N., and H. BOURNE, : Histochemistry of the normal skeletal muscle. In: Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie. Hrsgb. E. KUHN, Berlin, Heidelberg, New York 1966
- MAC BRIDE, R.G., R.J. PRZYBYLSKI, 1980: Purified lectin from skeletal muscle inhibits myotube formation in vitro.
J. Cell Biol. 85, 617-625
- MEIER, E., 1983: Mikromorphologische Veränderungen des M. semitendinosus des Rindes nach unterschiedlichen Gefrier- und Auftauzyklen.
Ber. 28. Europ. Fleischforscherkongreß, Madrid, Bd.I, 156-159
- MERYMAN, H.T., 1968: Effects of hypertonic solutions on red cells.
Nature (London) 218, 333-336
- MERYMAN, H.T., 1970: The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: The Frozen Cell. Eds.: G.E.W. Wolstenholme and M.O. CONNOR
J. & A. CHURCHILL, London, 51-67
- MERYMAN, H.T., 1971: Osmotic stress as a mechanism of freezing injury.
Cryobiology 8, 459-500
- MICKELSON, J.R., 1983: Calcium transport by bovine skeletal muscle mitochondria and its relationship to postmortem muscle.
Meat Sci. 9, 205-231
- MOOR, H., 1964: Gefrierfixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie.
Z. Zellforsch. 62, 546-580
- MOREL, J.E., and I. PINSET-HÄRSTRÖM, 1975: Ultrastructure of the contractile system of the striated skeletal muscle and the processes of muscular contraction, I. Ultrastructure of the myofibril and source of energy.
Biomedicine 22, 88-96
- MORRIS, G.J., and A. CLARKE, (eds.), 1981: Effects of low temperatures on biological membranes.
London, Academic Press

- NICKEL, R., A. SCHUMMER, und E. SEIFERLE, 1987: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. I.
Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg
- NILSSON, S.F., and M.J. WAXDAL, 1978: Isolation and characterization of lectin binding properties from murine lymphoid cells.
Biochemistry 17, 903-910
- OGATA, T.A., 1958: A histochemical study of the red and white muscle fibers. I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibers.
Acta Med. Okayama 12, 216-221
- OGATA, T.A., and M. MORI, 1964: Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles.
J. Histochem. Cytochem. 12, 171-184
- OKITANI, A., Y. MATSUKURA, T. MATSUMOTO, M. FUYIMAKI, and H. KATO, 1981: Identification of the proteinases responsible for the post-mortem degradation of myofibrillar proteins.
Proceed. 27th Europ. Meat Res. Workers, Wien, Vol. 1, 121-124
- OKUBANO, A.O., and J.R. STOFFER, 1975: Postmortem glycolysis and isometric thaw tension development and decline in bovine skeletal muscle undergoing thaw rigor.
J. Food Sci. 40, 955-959
- PADYKULA, H.A., and G.F. GAUTHIER, 1967: Morphological and cytochemical characteristics of fibre types in normal mammalian skeletal muscle. In: Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders. Ed.: MILHORAT, A.T., Excerpta Medica, Amsterdam
- PARRISH, F.C., 1978: Changes in myofibrillar proteins during postmortem tenderization of bovine muscle.
Ber. 24. Europ. Fleischforscherkongreß, Kulmbach, Bd. II, 29-42
- PENA, S.D.J., B.B. GORDON, G. KARPAIL, and S. CARPENTER, 1981: Lectin histochemistry of human skeletal muscle.
J. Histochem. Cytochem. 29, 542-546
- PENNY, I.F., 1980: The enzymology of conditioning. In: Developments in Meat Science. Ed.: R. LAWRIE. Appl. Science Publisher LTD London, Bd. I, 115-143

- DE QUERVAIN, M.R., 1975: Crystallisation of water, a review. In: Freeze drying and advanced food technology. Eds.: S.A. GOLDBLITH, L. REY W. ROTHMAYER. London Academic Press. 3-16
- RAHELIC, S., und S. PUAC, 1985: Structure of beef longissimus dorsi muscle frozen at various temperatures: Part 1 - Histological changes in muscle frozen at -10, -22, -33, -78, -115, and -196 °C.
Meat Sci. 14, 63-73
- RAHELIC, S., S. PUAC, and A.H. GAWWAD, 1985: Structure of beef longissimus dorsi muscle frozen at various temperatures: Part 2 - Ultrastructure of muscle frozen at -10, -22, -33, -78, -115 °C.
Meat Sci. 14, 73-83
- RANVIER, L., 1873: Propriétés et structures différentes de muscles rouges et des muscles blancs chez les lapin et chez les raies.
C.R. Acad. Sci. 77, 1030-1039
- RAO, C.N., GOLDSTEIN I.J., LIOTTA, L.A., 1983: Lectin-binding domains of laminin.
Arch. Biochem. Biophys. 227, 118-124
- RICHTER, P., L. SCHÖBERLEIN, K. RENATUS und V. BERGMANN, 1985: Erfassung postmortaler Veränderungen am Muskulus longissimus dorsi von Schweinen.
Fleisch 39, 228-230
- ROMANUL, F.C.A., 1964: Enzymes in muscle. 1. Histochemical studies of enzymes in individual muscle fibers.
Arch. Neurol. 11, 355-368
- ROTH, J., 1978: The lectins: molecular probes in cell biology and membrane research.
Gustav Fischer Verlag, Jena
- RUBINSKY, B., E.G. CRAVALHO, and B. MILLIV, 1980: Thermal stresses in frozen organs.
Cryobiology 17, 66-73
- SCHEUNERT, A., und A. TRAUTMANN, 1987: Lehrbuch der Veterinärphysiologie. 7. Aufl., Hrgb. G. WITTKE, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- SCHMALBRUCH, H., 1970: Die quergestreiften Muskelfasern des Menschen.
Ergebn. Anat. Entwickl. Gesch. 43, 7-75

- SIKORSKI, Z.E., 1978: Protein changes in muscle foods due to freezing frozen storage.
Int. J. of Refrigeration, 1, 173-180
- SIMATOS, D., and J.M.TURC, 1975: Fundamentals of freezing in biological systems. In: Freeze drying and advanced food technology. Eds.: S.A.GOLDBLITH, L.REY, W.ROTHMAYER. London Academic Press, 17-28
- SQUIRE, J., 1981: The structural basic of muscular contraction.
Plenum Press, New York, London
- STEIN, J.M., and H.A.PADYKULA, 1962: Histochemical classification of individual skeletal muscle fibres of the rat.
Amer. J. Anat. 110, 103-115
- SUZUKI, A., D.E.GOLL, J.SINGH, R.ALLEN, and M.H.STROMER, 1976: Some properties of purified skeletal muscle α -Actinin.
J. Biol. Chem. 251, 6860-6870
- VANA, V., P.RAUCH and J.KAS, 1982: Postmortem changes of enzymatic activities and morphology in meat.
In: Recent developments in food analyses. Hrsgb. W.BALTES
Verlag Chemie, Weinheim, 300-306
- VENUGOPAL, B., and H.E.BAILEY, 1978: Chemical properties of porcine leucozyte lysosomal hydrolases.
J. Food Sci. 43, 1752-1756
- WHITING, R.C., and J.F.RICHARDS, 1978: Calcium uptake and ATPase activity by sarcoplasmatic reticulum of red and white poultry muscle.
J. Food Sci. 43, 662-665
- VINEGRAD, S., 1970: The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 55, 77-88
- YELLIN, H., and L.GUTH, 1970: The histochemical classification of muscle fibers.
Exp. Neurol. 26, 424-432

Für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Beratung und die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. H.-G. Liebich sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. F. Sinowatz danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Für die umfangreiche Mithilfe bei der Erstellung der lichtmikroskopischen Präparate danke ich Fräulein Settles.

Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Schnitte danke ich sehr herzlich Fräulein Winkler.

Für die Beratung und die Einweisung in die lichtmikroskopischen Präparationstechniken bin ich Fräulein Rußmeier zu Dank verpflichtet.

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls für ihre Unterstützung danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann für die hervorragende Schreibarbeit und insbesondere für das große, mir jederzeit entgegengebrachte Verständnis.

LEBENS LAUF

Name: Gabriele Kammerl, geb. Steck

Geburtstag: 15. März 1961

Geburtsort: Dachau

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet seit dem 3. Juni 1983 mit
Anton Kammerl
1 Kind: Juliane, geb. am 14. Oktober 1983

Eltern: Karl Steck
Burgunda Steck, geb. Kobras

Abitur: 26. Juni 1981
Adolf-Weber-Gymnasium, München

Studium: WS 1981/82 bis 1987 Studium der Tiermedi-
zin an der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen: 29. April 1987

Approbation: 11. August 1987

